

Untersuchungen zur Replikationsstrategie des humanpathogenen Norovirus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr.rer.nat.)

vorgelegt der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplombiologin Ulrike Scheffler

geboren am 26.07.1978 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Rödel
2. PD Dr. med. Jacques Rohayem
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Rolf Hilgenfeld

Tag der Einreichung: 04.01.2008

Tag der Verteidigung: 29.09.2008

Teile der dargestellten Arbeit sind Gegenstand folgender Publikationen:

Publikationen:

Scheffler U, Rudolph W, Gebhardt J and Rohayem J

Differential cleavage of the norovirus polyprotein precursor by two active forms of the viral protease

J Gen Virology, Jul 2007; 88(Pt7):2013 - 2018.

Rohayem J, Jäger K, Robel I, **Scheffler U**, Temme A and Rudolph W

Characterization of norovirus 3D^{pol} RNA-dependent RNA polymerase activity and initiation of RNA synthesis

J Gen Virology, Sep 2006; 87(Pt9):2621-2630

Rohayem J, Robel I, Jäger K, **Scheffler U** and Rudolph W

Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3D^{pol}

J Virology, Jul 2006; 80(14):7060- 7069

Konferenzbeiträge:

Scheffler U, Rudolph W, Gebhardt J and Rohayem J

Characterization of the Proteolytic Activity of Norovirus 3C Protease

**Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting, München, Deutschland, 15.-18. März 2006,
Poster VGE 16**

Rudolph W, Jäger K, **Scheffler U**, Robel I and Rohayem J

Biochemical characterisation of norovirus RNA-dependent RNA-polymerase

**Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting, Hannover, Deutschland, 16.-19. März 2005,
Poster p.305**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Entdeckung des Norovirus	2
1.2 Morphologie und Taxonomie der Familie <i>Caliciviridae</i>	3
1.3 Genomorganisation der <i>Caliciviridae</i>	5
1.4 Infektion der Wirtszelle.....	7
1.5 Replikation des NV-Genoms	11
1.6 RNA-abhängige RNA Polymerase 3DL ^{pol}	13
1.7 3CL-Protease der <i>Caliciviridae</i>	16
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Chemikalien/Reagenzien.....	25
2.1.3 Enzyme	25
2.1.4 Feinchemikalien/Materialien.....	25
2.1.5 Kit-Systeme	27
2.1.6 Antikörper	27
2.1.7 Primer	28
2.1.8 Vektoren	32
2.1.9 Rekombinante Plasmide	32
2.1.10 Peptide	34
2.1.11 Inhibitoren	34
2.1.12 <i>E.coli</i> Stämme	35
2.1.13 Eukaryotische Zellen.....	35
2.1.14 Medien.....	35
2.1.14.1 Bakterienkulturmedien	35
2.1.14.2 Zellkulturmedien	36

2.1.15 Puffer und Lösungen	36
2.1.15.1 Agarose Gelelektrophorese	36
2.1.15.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.1.15.3 Western Blot.....	38
2.1.15.4 Proteinaufreinigung	38
2.1.15.4.1 Resuspensionspuffer:	38
2.1.15.4.2 Ni-Affinitätschromatographie	39
2.1.15.4.3 Kationenaustauschchromatographie.....	39
2.1.15.4.4 Reverse Phase Chromatographie (HPLC).....	39
2.1.16 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	40
2.1.17 Lyse eukaryontischer Zellen	40
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Amplifikation von cDNA- Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Ketten Reaktion (PCR).....	41
2.2.1.1 Standard-PCR.....	41
2.2.1.2 Overlap-Extension-PCR (Pogulis <i>et al.</i> , 1996)	42
2.2.1.3 Screening PCR	42
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.3 DNA-Aufreinigung	44
2.2.4 Klonierung.....	44
2.2.4.1 Topo TA Klonierung.....	44
2.2.4.2 Klonierung durch Ligation	44
2.2.4.2.1 Restriktionsverdau.....	44
2.2.4.2.2. Ligation mit Hilfe der T4 DNA-Ligase.....	44
2.2.4.2.3 Ligation mit Hilfe des Fast Link™ Ligation Kits	45
2.2.4.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	45
2.2.5 Sequenzierung	46
2.2.6 <i>site directed mutagenesis</i>	46
2.2.7 Methoden für die Arbeiten mit humanen Zellen	47
2.2.7.1 Kultivierung von 293T-Zellen	47
2.2.7.2 Ernte einer 293T-Zellkultur	47
2.2.7.3 Bestimmung der Zellzahl	47
2.2.7.4 Konservierung einer 293T-Zellkultur	48
2.2.7.5 Transiente Transfektion von 293T-Zellen.....	48
2.2.7.6 Lyse der eukaryontischen Zellen.....	48
2.2.8 Proteinchemische Methoden	49

2.2.8.1 Heterologe Expression in <i>E.coli</i>	49
2.2.8.2 Zellaufschluss durch Ultraschall	49
2.2.8.3 Zellaufschluss mit Hilfe von Aluminiumoxid.....	49
2.2.8.4 Ammoniumsulfatpräzipitation	49
2.2.8.5 Dialyse.....	50
2.2.8.6 Proteinbestimmung.....	50
2.2.8.7 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	50
2.2.8.8 Western Blot (Semi-dry)	50
2.2.8.9 Immunologischer Nachweis	51
2.2.9 Chromatographieverfahren für die Proteinaufreinigung	51
2.2.9.1 Kationenaustauschchromatographie.....	51
2.2.9.2 Metallchelatchromatographie- Ni^{2+} -Affinitätschromatographie.....	51
2.2.9.3 Gelfiltration mit Hilfe der FPLC	52
2.2.10 Proteolytische Aktivitätstests	52
2.2.10.1 <i>Time course</i> Experiment in <i>E.coli</i> zur Anaylse der 3CL ^{pro} <i>cis</i> -Aktivität	52
2.2.10.2 Spaltungsanalyse mit Hilfe der <i>in vitro</i> Transkription/Translation.....	52
2.2.10.3 <i>In vitro trans</i> -Spaltungsassay	52
2.2.10.4 Kompetitionsassay zur Untersuchung der relativen Spaltspezifitäten	53
2.2.10.5 Berechnung der relativen Spalteffizienzen	53
2.2.10.6 Statistische Berechnungen.....	53
2.2.10.7 Inhibierungstest der 3CL ^{pro}	54
2.2.10.8 Analysemethoden	54
2.2.10.8.1 <i>Reversed-phase Chromatographie</i> (HPLC)	54
2.2.10.8.2 Massenspektrometrie.....	54
3. Ergebnisse	56
3.1 Generierung eines Norovirus Genotyp II Volle-Länge cDNA Klons.....	56
3.1.1 Amplifikation der NV-Einzelfragmente A, B, C, D1, D2, E	56
3.1.2 Konstruktion der NV-Fusionsfragmente ABC und D1D2E	58
3.1.3 Generierung des NVII-Volle Länge cDNA Klons durch Fusion von ABC und D1D2E	60
3.2 Charakterisierung der Prozessierung des ORF1-Polypeptides	61
3.2.1 <i>Cis</i> -Spaltung des NVII-ORF1 $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ Vorläufer Proteins	62

3.2.1.1 Kotranslationale Spaltung des Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ und Freisetzung des $3CL^{pro}$ Fragmentes.....	62
3.2.1.2 <i>Cis</i> -Spaltung des Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ im eukaryotischen Zellsystem	66
3.2.2 Aufreinigung von $3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$	67
3.2.2.1 Aufreinigung des $3CL^{pro}$ Fragmentes.....	68
3.2.2.2 Aufreinigung des Fusionsproteins $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$	70
3.2.3 Untersuchung zur <i>trans</i> Spaltaktivität von $3CL^{pro}$ und dem Fusionsprotein $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$	72
3.2.3.1 <i>In trans</i> Prozessierung von $p37/2C^{NTPase}$ durch $3CL^{pro}$	72
3.2.3.2 <i>In trans</i> Prozessierung des Spaltmotiv $2C^{NTPase}/p20$ durch $3CL^{pro}$	77
3.2.3.3 <i>Trans</i> -Spaltungsassays zur Analyse der Prozessierung von $p20/VPg$, $VPg/3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}/3DL^{pol}$ durch $3CL^{pro}$	80
3.2.3.4 <i>In trans</i> -Spaltungstests mutierter Peptide	82
3.2.3.5 <i>In trans</i> Aktivität des Fusionsproteins $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ an den Spaltmotiven $p37/2C^{NTPase}$ und $2C^{NTPase}/p20$	84
3.2.3.6 Prozessierung des Spaltmotivs $VPg/3CL^{pro}$ durch das Fusionsprotein $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$	86
3.2.3.7 Die Peptide $p37/2C^{NTPase}$, $2C^{NTPase}/p20$ und $VPg/3CL^{pro}$ wurden von $3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ mit unterschiedlichen Effizienzen prozessiert.....	91
3.2.4 Untersuchungen zur Prozessierung des Vorläuferproteins $p20VPg$ im eukaryotischen Zellsystem	93
3.2.5 Spaltung des vom <i>ORF1</i> kodierten Polyproteins in Abhängigkeit der $3CL^{pro}$ im zellfreien System	95
3.2.6 Expression des NV-cDNA-Genoms in 293T Zellen.....	97
3.2.7 Regulation der $3CL^{pro}$ Aktivität durch das Vorläuferprotein $p20VPg$	98
3.2.7.1 Aufreinigung des Vorläuferproteins $p20VPg$	98
3.2.7.2 Das Vorläuferprotein $p20VPg$ reguliert die Aktivität von $3CL^{pro}$	99
3.3 Inhibierung der $3CL^{pro}$	101
4. Diskussion	103
4.1 Sequentielle Prozessierung des NV-Polyproteins	104
4.1.1 <i>cis</i> -Spaltung des Polyproteins	104
4.1.2 <i>Trans</i> -Spaltung des Polyproteins	107

4.1.2.1 Prozessierung der Spaltmotive zwischen den Proteinen p37 und 2C ^{NTPase} und zwischen der 2C ^{NTPase} und dem Protein p20 <i>in trans</i>	107
4.1.2.2 Expressionsstudien des <i>ORF1</i> im zellfreien System zur Untersuchung der Initiation der Polyproteinprozessierung	109
4.1.2.3 Charakterisierung der sequentiellen Prozessierung des N-Terminalen Bereiches des Polyproteins	110
4.1.2.4 Prozessierung des Vorläuferproteins p20VPg3CL ^{pro} 3DL ^{pol}	111
4.1.3 Sequentielle und differentielle Prozessierung des Polyproteins	113
4.2 Regulation der 3CL ^{pro} Aktivität durch das Vorläuferprotein p20VPg	116
4.3 Expression des NV-Volle Länge Klons in 293T-Zellen	118
4.4 Inhibierung der 3CL ^{pro} Aktivität	120
5. Zusammenfassung	123
6. Literaturverzeichnis	125

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Typischer Verlauf einer Norovirusinfektion bei immunkompetenten Patienten.....</i>	2
<i>Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Norwalk-Virus.....</i>	3
<i>Abbildung 3: Klassifikation der Genera der Familie Caliciviridae.....</i>	5
<i>Abbildung 4: Vergleich der Genomorganisation von Norovirus und Sapovirus</i>	7
<i>Abbildung 5: Biosynthese der humanen ABH-Antigene und Lewis HBG-Antigene.....</i>	9
<i>Abbildung 6: Strukturanalyse des NV-Kapsidproteins.....</i>	10
<i>Abbildung 7: Hypothetischer Norovirus-Replikationszyklus.....</i>	13
<i>Abbildung 8: Kristallstruktur der Norovirus-3DL^{pol}</i>	15
<i>Abbildung 9: Spaltstellen innerhalb des NV-ORF1 Polyproteins.....</i>	17
<i>Abbildung 10: Modelle der dreidimensionalen Strukturen der Calicivirus 3CL^{pro} Proteasen.....</i>	18
<i>Abbildung 11: Sequenzvergleich verschiedener NV-3CL^{pro} Sequenzen.....</i>	19
<i>Abbildung 12: Allgemeiner Reaktionsmechanismus für Cystein-Proteasen.....</i>	21
<i>Abbildung 13: Skizze zur Herstellung des NV-Volle Länge cDNA-Genoms.....</i>	57
<i>Abbildung 14: Amplifikation der NV-cDNA-Einzelfragmente</i>	58
<i>Abbildung 15: Generierung der beiden Subfragmente ABC und DID2E</i>	59
<i>Abbildung 16: Generierung des NV-GGII/4/Dresden/1997/GE -Volle Länge cDNA-Klons.....</i>	61
<i>Abbildung 17: Schematische Darstellung des ORF1 Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{po}$</i>	62
<i>Abbildung 18: Cis-Aktivitätstest des NVII-ORF1 Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$</i>	64
<i>Abbildung 19: Prozessierungsstudie des NVII-ORF1 Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$ im zeitlichen Verlauf.....</i>	65
<i>Abbildung 20: Prozessierung des NVII-ORF1 Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$ in 293T-Zellen.....</i>	67
<i>Abbildung 21: Aufreinigung des aus dem Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$ freigesetzten 3CL^{pro} Fragmentes.....</i>	69
<i>Abbildung 22: Schematische Darstellung des ORF1 Fusionsproteins $\Delta VPg3CL^{pro} \mu_{E1189A} 3DL^{pol}$</i>	70
<i>Abbildung 23: Aufreinigung des Fusionsproteins 3CL^{pro} $\mu_{E1189A} 3DL^{pol}$</i>	71
<i>Abbildung 24: Aminosäuresequenz der Peptide, die die authentischen Spaltmotive des Polyproteins präsentierten.....</i>	72

Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm zur Spaltungsanalyse des Peptids $p37/2C^{NTPase}$	74
Abbildung 26: Massenspektrometrische Analyse der Spaltfragmente P1 und P2 des Peptids $p37/2C^{NTPase}$	76
Abbildung 27: HPLC-Chromatogramm zur Spaltungsanalyse des Peptids $2C^{NTPase}/p20$	78
Abbildung 28: Massenspektrometrische Analyse der Spaltprodukte des Peptids $2C^{NTPase}/p20$	79
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramme zur Spaltanalyse der Peptide $p20/VPg$, $VPg/3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}/3DL^{pol}$	81
Abbildung 30: HPLC-Chromatogramme zur Spaltungsanalyse der mutierten Peptide $VPg/p20\mu TP2L$ und $3CL^{pro}/3DL^{pol}TP3E$	83
Abbildung 31: HPLC-Chromatogramme zur Untersuchung der trans-Spaltaktivität des Fusionsproteins $3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$ an den Peptiden $p37/2C^{NTPase}$ und $2C^{NTPase}/p20$	85
Abbildung 32: HPLC-Chromatogramme zur Spaltungsanalyse der Peptide $p20/VPg$ und $3CL^{pro}/3DL^{pol}$ durch das Fusionsprotein $3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$	87
Abbildung 33: HPLC-Chromatogramme zur Untersuchung der Spaltung des Peptids $VPg/3CL^{pro}$ durch das Fusionsprotein $3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$	88
Abbildung 34: Massenspektrometrische Analyse der Spaltprodukte des Peptids $VPg/3CL^{pro}$	90
Abbildung 35: Differentielle trans Spaltung der Peptide $p37/2C^{NTPase}$, $2C^{NTPase}/p20$ und $VPg/3CL^{pro}$ durch $3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$	92
Abbildung 36: Koexpression von $p20VPg$ und $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ in 293T Zellen	94
Abbildung 37: Prozessierung des ORF 1 Polyproteins in Abhängigkeit der $3CL^{pro}$ -Aktivität	96
Abbildung 38: Schematische Darstellung des ORF1 Vorläuferproteins $p20VPg$ im Vergleich zum NV-ORF1 Polyprotein	98
Abbildung 39: Aufreinigung des Vorläuferproteins $p20VPg$	99
Abbildung 40: Regulierung der $3CL^{pro}$ Aktivität durch $p20Vpg$	100
Abbildung 41: Bestimmung des IC_{50} -Wertes verschiedener potentieller antiviraler Substanzen	102
Abbildung 42: Schematische Darstellung der differentiellen und sequentiellen Spaltung des NV-Polyproteins durch $3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$	115

Abkürzungsverzeichnis

μ	mutiert
μCi	MicroCurie
μg	Microgramm
μl	Microliter
μM	Micromolar
3CL	3C-like-Protease (<i>engl.</i> 3C-ähnliche Protease)
3CL ^{pro}	3C-like-Protease (<i>engl.</i> 3C-ähnliche Protease)
3DL ^{pol}	3D-like-Polymerase (<i>engl.</i> 3D-ähnliche Polymerase)
3CL ^{pro} 3DL ^{pol}	3C3D-like Precursorprotein (<i>engl.</i> 3C3D-ähnliches Vorläuferprotein)
A	Adenin
aa	<i>amino acid(s)</i> (<i>engl.</i> , Aminosäure[n])
Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	hinzufügen
Ala (A)	Alanin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxysulfat
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Aspartat
BCA	Bicinchoninic acid (<i>engl.</i> , Bicinchoninsäure)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	<i>copy-DNA</i> (<i>engl.</i> , RNA dient als Template um mit Hilfe der RT-PCR DNA zu amplifizieren)
CMK	Chlormethylketon
CoV	Coronavirus
Cys (C)	Cystein
CV	Caliciviren
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dATP	Desoxyadenosidtriphosphat

dCTP	Desoxycytosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e) (dATP, dGTP, dCTP und dTTP)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eiF	<i>eukaryotic initiation factor</i> (<i>engl.</i> , Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Spalteffizienz
FCV	felines Calicivirus
for	forward (<i>sense, engl.</i> , vorwärts gerichtet) [Primer]
FPLC	fast performance chromatography
G	Guanin
GG	Genogruppe
Glu (E)	Glutamat
Gln (Q)	Glutamin
Gly (G)	Glycin
h	Stunden
HBGAs	histo blood group antigens (<i>engl.</i> Humane Blutgruppenantigene)
His (H)	Histidin
HPLC	<i>high performance chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (<i>engl.</i> , Merettich-Peroxidase)
HuCV	humane Caliciviren
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration 50</i> (<i>engl.</i> , Konzentration die zu 50 % die Aktivität eines Enzyms herabsetzt)
Ig	Immunglobulin
Ile (I)	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> (<i>engl.</i> , Interne Ribosomenbindestelle)
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

Km	Michaelis-Menden-Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
mAU	<i>maximal Absorption-Unit (engl., maximale Absorptionseinheit)</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site (engl., multiple Klonierungsstelle)</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Milimoloar
MNV	murines Norovirus
Neo ^R	Neomycinresistenz
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSP	Nichtstrukturprotein
NV	Norovirus
OD	Optische Dichte
ori	<i>Origin of Replication (engl., Replikationsursprung)</i>
OV	<i>overlap (engl., überlappend)</i>
p	Protein
PAA	Polyacrylamid
PABP	poly (A)-Tail-Binding Protein (<i>engl., Poly (A)-Schwanz-Bindeprotein</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered Saline (engl., Phosphat gepufferte Saline)</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain Reaktion (engl., Polymerasekettenreaktion)</i>
pg	Picogramm
pmol	Picomol
PV	Poliovirus
RdRP	<i>RNA-dependent RNA-Polymerase (engl., RNA-abhängige RNA-Polymerase)</i>
rev	reverse (<i>antisense, engl., rückwärts gerichtet</i>) [Primer]
RHDV	<i>rabbit hemorrhagic disease virus</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid (engl., Ribonukleinsäure)</i>
rpm	rounds per minute (<i>engl., Umdrehungen pro Minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase
RTemp.	Raumtemperatur

SARS	Severe Acute Respiratory Syndrom (<i>engl.</i> , Schweres akutes Atemwegssyndrom)
SDS	Sodium-Dodecylsulfat (<i>engl.</i> , Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunden
Ser (S)	Serin
SH	Schwefelwasserstoff
SV	Sapovirus
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
T _{min}	Retentionszeit
U	Unit (<i>engl.</i> , Einheit)
ü. N.	über Nacht
V	Volt
Val (V)	Valin
VL	Volle Länge (cDNA-Klon)
VLP	<i>virus-like particles</i> (<i>engl.</i> , Viruspartikel)
V _{max}	maximale Geschwindigkeit
VP1	Virion-Protein 1
VP2	Virion-Protein 2
VPg	Viral Protein genome-linked (<i>engl.</i> , Genom-verbundenes virales Potein)
w/v	<i>weight per volume</i> (<i>engl.</i> , Gewicht pro Volumen)
wt	Wildtyp
Zeo ^R	Zeomycinresistenz
α-MAPI	anti-microbial alkaline protease inhibitor (<i>engl.</i> alkalischer Antimikrobieller Protease-Inhibitor)
λ	Phage-Lamba

1. Einleitung

Noroviren sind die häufigsten Verursacher von akuten, viral ausgelösten Gastroenteritiden (Gonin *et al.*, 2000; Nakata *et al.*, 2000; Vinje *et al.*, 1997). Auf Grund der hohen medizinischen Relevanz ist eine Norovirusinfektion seit dem 01.01.2001 in der Bundesrepublik Deutschland meldepflichtig (IFSG §42). Das Virus wird über verunreinigte Lebensmittel bzw. kontaminiertes Wasser übertragen (Deneen *et al.*, 2000; Mead *et al.*, 1999). Nach einer Inkubationsphase von 12 h – 48 h beträgt die akute Phase der Erkrankung, die mit Durchfall, Erbrechen, Fieber und abdominalen Schmerzen einhergehen kann, ca. 2 Tage (Caul, 1996). Ein typischer Verlauf einer von Noroviren bedingten Gastroenteritis ist in Abb. 1 dargestellt. Obwohl sich die Erkrankung in den meisten Fällen von selbst limitiert, sind insbesondere bei Kindern, älteren- sowie immunsupprimierten Personen durch Norovirus bedingte Gastroenteritiden aufgetreten, die zu Dehydrierungen führten und tödlich endeten (Mead *et al.*, 1999). Trotz einer geringen Ausscheidungsmenge von viralen Partikeln im Stuhl ist das Virus hoch infektiös. Es zeigte sich, dass geringste Virustiter (10-100 Virionen) für eine Neuinfektion ausreichen (Caul, 1996). Folglich ist die Wahrscheinlichkeit für nosokomiale Infektionen oder Epidemien in Altenheimen, in Schulen und Kindergärten sowie auf Kreuzfahrtschiffen hoch. Die Folgen von NV-bedingten Gastroenteritis-Epidemien verursachen hohe wirtschaftliche Kosten. Daraus erklärt sich auch die Dringlichkeit der Entwicklung von Impfstoffen bzw. Medikamenten gegen das Norovirus. Hierfür ist allerdings zunächst das genaue Verständnis zur Replikation und zur Vermehrung der Noroviren essentiell. Bisher erfolgt die Therapie lediglich symptomatisch durch Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution.

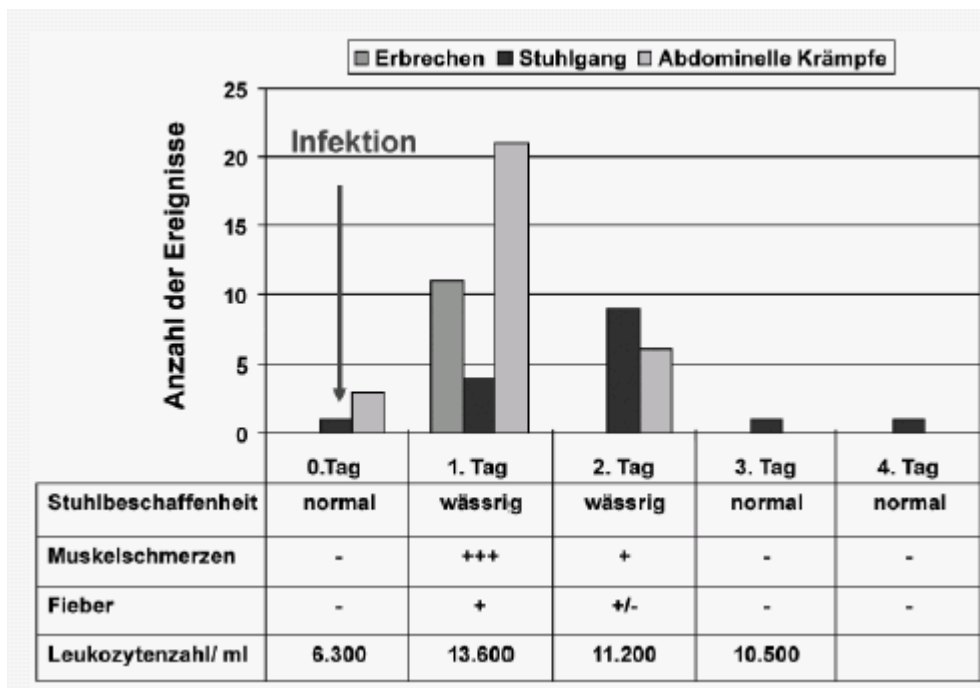


Abbildung 1: Typischer Verlauf einer Norovirusinfektion bei immunkompetenten Patienten

Infolge einer Norovirusinfektion sind nach ca. 12-24-stündiger Inkubationszeit Symptome wie Durchfall, Erbrechen, Fieber, Muskelschmerzen und abdominale Schmerzen zu verzeichnen. Am zweiten Tag nach der Infektion schwächen sich die Symptome ab. Am dritten Tag kommt die Infektion zum Erliegen (Koch et al., 2006).

1.1 Entdeckung des Norovirus

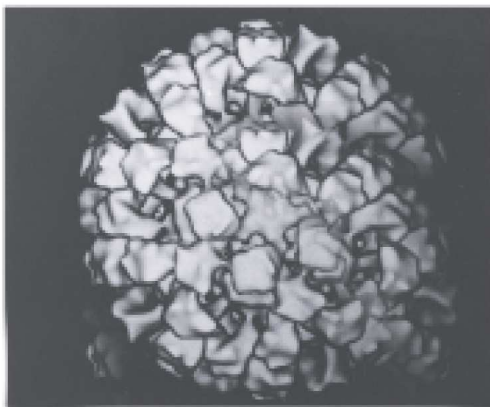
1968 wurde nach einer abakteriellen Gastroenteritisepidemie in Norwalk (USA), erstmals das Norwalk Virus beschrieben (Kapikian, 1996). Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen von Patientenstuhlproben konnten kleine, runde Viren mit einer strukturierten Oberflächenstruktur nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer geringen Größe von ca. 20-37 nm und ihrer elektronenmikroskopischen Erscheinung wurden sie zunächst der Familie der *Picornaviridae* zugeordnet (Caul and Appleton, 1982; Kapikian, 1996). Nachdem das Virion dieser Viren aus Stuhlproben im Jahr 1981 aufgereinigt wurde, konnte sowohl das Oberflächenprotein (Kapsid) als auch ein RNA-Fragment des viralen Genoms isoliert und genauer charakterisiert werden (Greenberg et al., 1981). Anhand der Analyse des isolierten 150 Basen großen RNA-Fragmentes aus dem viralen Polymerase-Gen, konnten diese Viren den positiv-strängigen RNA-Viren zugeordnet werden.

Diese Daten sowie die Sequenzierung der Genome des Norwalk-Virus (Jiang et al., 1993; Lambden et al., 1993) und des Norovirus Southampton (Lambden et al., 1995) ermöglichte die Zuordnung der SRSVs, zu der Familie der *Caliciviridae*.

1.2 Morphologie und Taxonomie der Familie *Caliciviridae*

Die Familie der *Caliciviridae* wird durch ein einzelsträngiges polyadenyliertes RNA Genom von positiver Polarität charakterisiert (Wawrzekiewicz *et al.*, 1968). Ein weiteres spezifisches Merkmal dieser Familie ist das Vorkommen eines einzigen Hauptstrukturprotein VP1 (Kapsid), das sowohl für die Virus Assemblierung, die Antigenität als auch für die Rezeptorbindung notwendig ist (Chen *et al.*, 2006). 90 Dimere der Kapsidproteine und ein bis zwei Kopien des untergeordneten VP2 Proteins lagern sich zu einem Virion mit ikosaedrischem Aufbau zusammen, das nicht umhüllt ist (Prasad *et al.*, 1994). Für den korrekten Zusammenbau des Virions ist das VP2 Protein wahrscheinlich nicht essentiell, allerdings scheint es für die Infektiosität der Viruspartikel notwendig zu sein (Sosnovtsev *et al.*, 2005). Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Virions sind 32 der Ikosaeder als kelchförmige Vertiefungen an der Oberfläche der Virionen erkennbar (Abb. 2). Auf Grund dieser Oberflächenstrukturen wurde diese Virusfamilie als *Caliciviridae* (*kalyx* lateinisch für Kelch) bezeichnet (Black *et al.*, 1978).

A



B

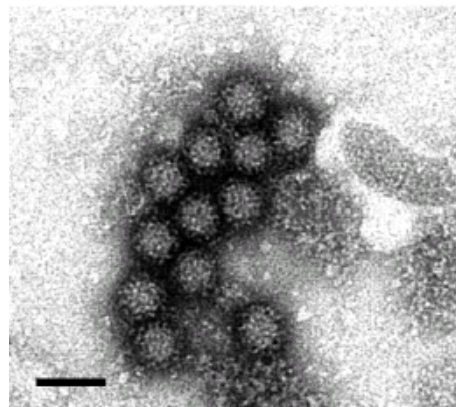


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Norwalk-Virus

A Bioinformatische Modellierung von rekombinanten Norwalk virus-like particles (VLPs) anhand von cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Prasad *et al.*, 1994).

B Elektronenmikroskopische negativ-Kontrastaufnahme des NV-GenogruppeII/4/Dresden/1997/GE aus humanen Stuhlproben (Calicilab, TU-Dresden).

Allen Caliciviren ist darüber hinaus die kovalente Verknüpfung eines kleinen 15 kDa Proteins, dem VPg Protein, am 5'-Terminus des RNA-Genoms gemeinsam, das eine analoge Funktion zur Cap-Struktur aufweist (Burroughs and Brown, 1974; Herbert *et al.*, 1997). Die Veröffentlichung der ersten kompletten Calicivirus cDNA Genome zu Beginn der 1990 Jahre ermöglichte die taxonomische Gruppierung der Vertreter der *Caliciviridae*.

Anhand von phylogenetischen Analysen (Abb. 3) sowie der biologischen und klinischen Merkmale, wurde die Familie der *Caliciviridae* in vier Genera unterteilt: Dazu zählen die beiden nicht-humanpathogenen Genera *Vesivirus* und *Lagovirus*. Ein Vertreter der *Vesiviren* ist das feline Calicivirus (FCV), ein Erreger von Atemwegserkrankungen bei Katzen. Den *Lagoviren* wird die Spezies *rabbit hemorrhagic disease virus* (RHDV) zugeordnet. Desweiteren werden die humanpathogenen Genera *Norovirus* (ehemals *Norwalk-like viruses*) und *Sapovirus* (ehemals *Sapporo-like viruses*) unterschieden (Mayo, 2002). Der Genus *Norovirus* wird in die Genogruppe I (Norwalk/1968/US) und die Genogruppe II (Lordsdale/1994/UK, Dresden/1997/GE) unterteilt. Zu den *Noroviren* Genogruppe I zählen die erstmals 1968 in Norwalk identifizierten SRSVs (*small round structured viruses*). Sie unterscheiden sich in ihrer Oberflächenmorphologie, im Genomaufbau sowie in ihrer Antigenität von den ehemals als klassischen humanen Caliciviren (huCV) bezeichneten Viren, zu denen heute das Sapovirus gezählt wird. Obwohl die Caliciviren ursprünglich in die Familie der *Picornaviridae* eingeordnet wurden, können alle vier Genera der *Caliciviridae* heute anhand von phylogenetischen Analysen deutlich von der Familie der *Picornaviridae* abgegrenzt werden (Berke *et al.*, 1997).

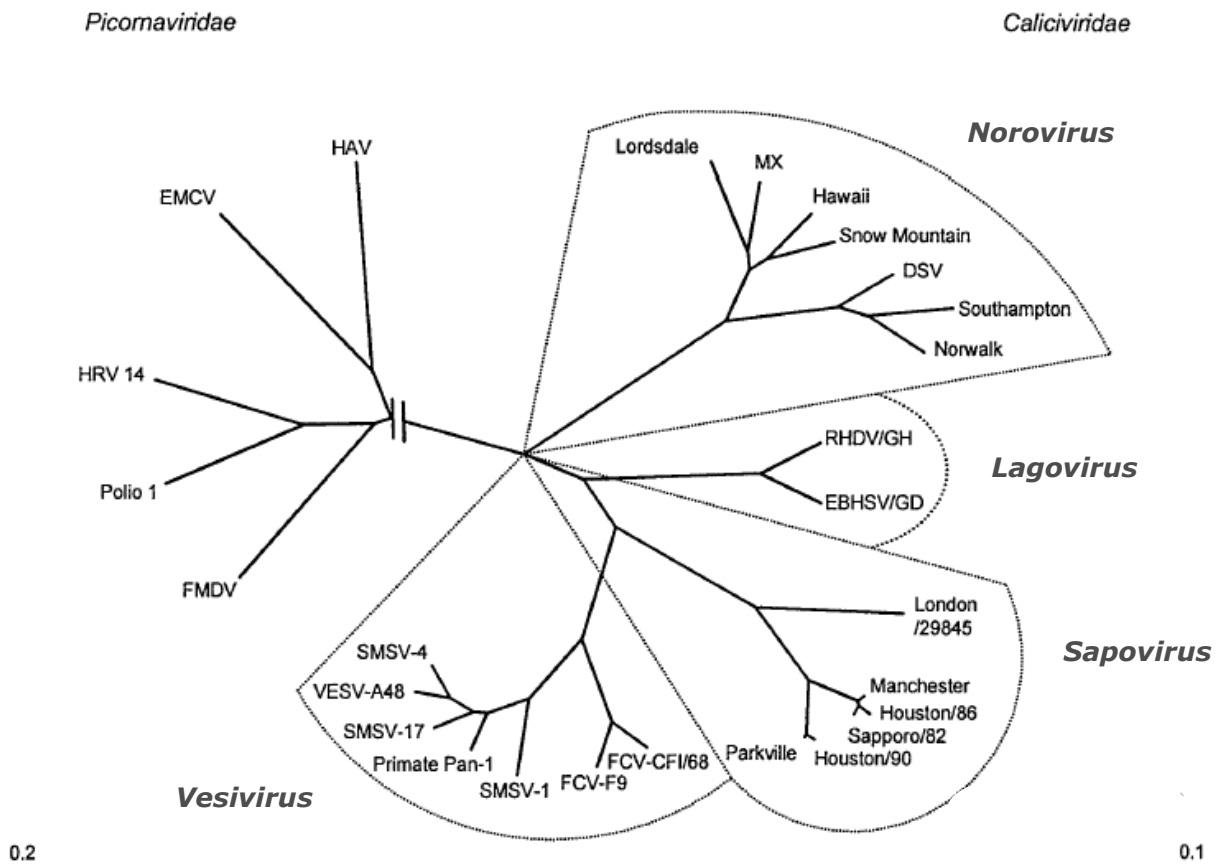


Abbildung 3: Klassifikation der Genera der Familie Caliciviridae

Durch Sequenzvergleich der kodierenden Sequenz für das Kapsid Protein konnte ein Phylogramm erstellt werden, in dem die Caliciviridae in die vier Genera Vesivirus, Lagovirus, Norovirus und Sapovirus unterteilt werden. Anhand des Phylogramms wird deutlich, dass die Familie der Picornaviridae von der Familie der Caliciviridae klar abgegrenzt werden kann (adaptiert von (Green et al., 2000)).

1.3 Genomorganisation der Caliciviridae

Die Familie der Caliciviridae weist ein sehr kleines, ca. 7500 nt langes Genom positiver Polarität auf, das am 3'-Terminus polyadenyliert ist (Clarke and Lambden, 1997). Allen Caliciviren ist gemeinsam, dass sie im Verlauf der Replikation zwei RNA Transkripte generieren, ein genomisches- und ein subgenomisches RNA-Transkript. Das Vorkommen von genomischen und subgenomischen RNA-Transkripten wurde erstmals für FCV beschrieben (Ehresmann and Schaffer, 1977; Neill and Mengeling, 1988). Die genomische RNA umfasst das komplette einzelsträngige RNA Genom.

Bei den Genera *Norovirus* sowie *Vesivirus* kodiert die genomische RNA für drei offene Leserahmen (open reading frames, ORF). Der *ORF1* kodiert für die nicht-strukturellen Proteine p37, 2C^{NTPase}, p20, VPg, 3C-Protease (3CL^{pro}) und die RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRP; 3DL^{pol}) (Abb 4A). *ORF2* und *ORF3* kodieren für die strukturellen Proteine, wobei der *ORF2* für Kapsid-Proteine (VP2) und der *ORF3* für ein kleines basisches Protein (VP2) kodiert. Der Translationsstart des vom *ORF2* kodierten Proteins wird durch eine Verschiebung des *ORF1* Leserahmens von -1 erreicht, hierbei überlappt sich der *ORF1* an seinem 3' Terminus um 17 Nukleotide (*Norovirus*, Genogruppe 1) bzw. 20 Nukleotide (*Norovirus*, Genogruppe 2) mit dem 5'-Terminus des *ORF2*. Der Translationsstart des *ORF3* wird durch eine Leserasterverschiebung von +1 zum *ORF2* gewährleistet, wobei sich die beiden offenen Leserahmen in einem Nukleotid überlappen (Clarke and Lambden, 2000). *ORF2* und *ORF3* werden im Verlauf der Replikation als separate subgenomische RNA repliziert, wodurch eine gesteigerte Expression der strukturellen Proteine ermöglicht wird (Jiang *et al.*, 1993).

Die RNA-Genome von *Sapovirus* und *Lagovirus* kodieren nur für zwei offene Leserahmen (Abb. 4B). Bei diesen beiden Genera kodiert der *ORF1* gleichzeitig für das Hauptstrukturprotein, das VP1 (Kapsid) und für die nicht-strukturellen Proteine. Das strukturelle VP2 Protein wird in einem zweiten Leserahmen kodiert. Die Translation des *ORF2* wird durch eine Leserasterverschiebung um -1 im Vergleich zum *ORF1*-Leserahmen gewährleistet (Liu *et al.*, 1995).

An den 5'-Termini der genomischen- und der subgenomischen RNA befinden sich konservierte Motive. Diesen obliegt möglicherweise eine Funktion bei der Regulation der Transkription bzw. bei der Virusverpackung (Lambden *et al.*, 1995).

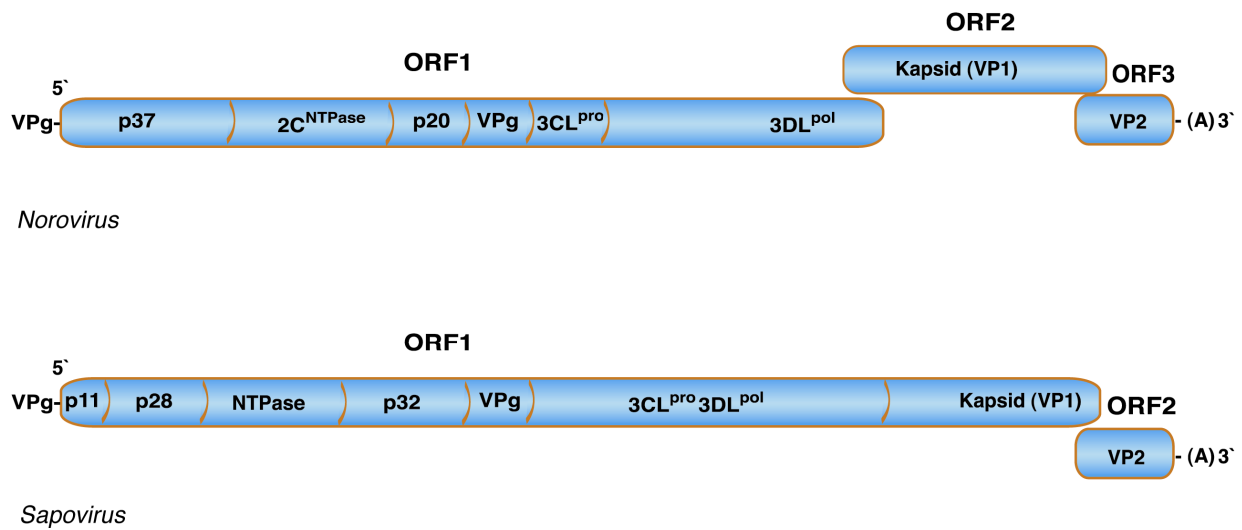


Abbildung 4: Vergleich der Genomorganisation von Norovirus und Sapovirus

A: Das Genom der Noroviren besteht aus drei offenen Leserahmen, wobei der ORF1 für das N-terminale Protein p37, die 2C^{NTPase}, das Protein p20, das VPg Protein, die 3CL^{pro} und die 3DL^{pol} kodiert. Der ORF 2 und ORF3 kodiert für die Strukturproteine Kapsid (VP1) und VP2.

B: Das RNA-Genom der Sapoviren weist zwei offene Leserahmen auf. Der ORF1 kodiert für die Proteine p11, p28, NTPase, p32, VPg, 3CL^{pro} 3DL^{pol} sowie das Kapsidprotein. Der ORF2 kodiert für das Strukturprotein VP2.

1.4 Infektion der Wirtszelle

Vertreter der *Caliciviridae* können entweder Leberzellen (RHDV) bzw. Makrophagen (Mikami *et al.*, 1999) oder Schleimhautepithelzellen (FCV, Noro- und Sapoviren) infizieren (Cai *et al.*, 2002; Cheetham *et al.*, 2007). Während sich feline Caliciviren in Schleimhautepithelzellen der oberen Atemwege replizieren (Cai *et al.*, 2002), infizieren die humanen Caliciviren (Noroviren bzw. Sapoviren) resorbierende Darmepithelzellen (Enterozyten) des Dünndarmes (Cheetham *et al.*, 2007). Im Verlauf einer Norovirusinfektion erkennen die Kapsidproteine humane, gewebsspezifische Blutgruppenantigene (*histo blood group antigens*; HBGAs) als Rezeptoren, wobei die Bindung an die HBGAs stammspezifisch ist. Die Bindungsanalysen des NV-Virions wurden anhand von rekombinanten *virus-like particles* (VLPs), die in Insektenzellen exprimiert wurden, durchgeführt (Harrington *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003; Hutson *et al.*, 2003).

Bei den HBGAs handelt es sich um komplexe Kohlenhydrate, die mit Glycoproteinen bzw. mit Glycolipiden verknüpft sind und sowohl auf der Oberfläche von roten Blutkörperchen als auch auf der Oberfläche von Schleimhautepithelzellen vorkommen. Darüber hinaus können die HBGAs auch als freie Rezeptoren im Blut, im Speichel, in der Darmflüssigkeit und in der Milch vorliegen (Marionneau *et al.*, 2001). Die für die Rezeptorbindung des NV-Kapsidproteins relevanten HBGAs sind vorrangig die A Antigene, die H-Antigene vom Typ 1 und vom Typ 3 sowie die Lewis-Antigene. Individuen die diese Antigene exprimieren, werden als Sekretoren bezeichnet. Personen mit der Blutgruppe Null exprimieren das unmodifizierte H-Antigen, eine endständige L-Fucose. Ca. 20 % der Bevölkerung weisen eine Mutation im *FUT* Gen auf, das für die α 1,2-Fucosyltransferase kodiert. Liegt eine inaktive α 1,2-Fucosyltransferase vor, kann die Synthese der Kette 1 und 3 des H Antigens nicht stattfinden. Diese Individuen sind Antigen H negativ und werden als Nicht-Sekretoren bezeichnet (Abb. 5). Personen des Nicht-Sekretortyps sind interessanterweise resistent gegenüber einer Norovirusinfektion (Harrington *et al.*, 2004; Marionneau *et al.*, 2002).

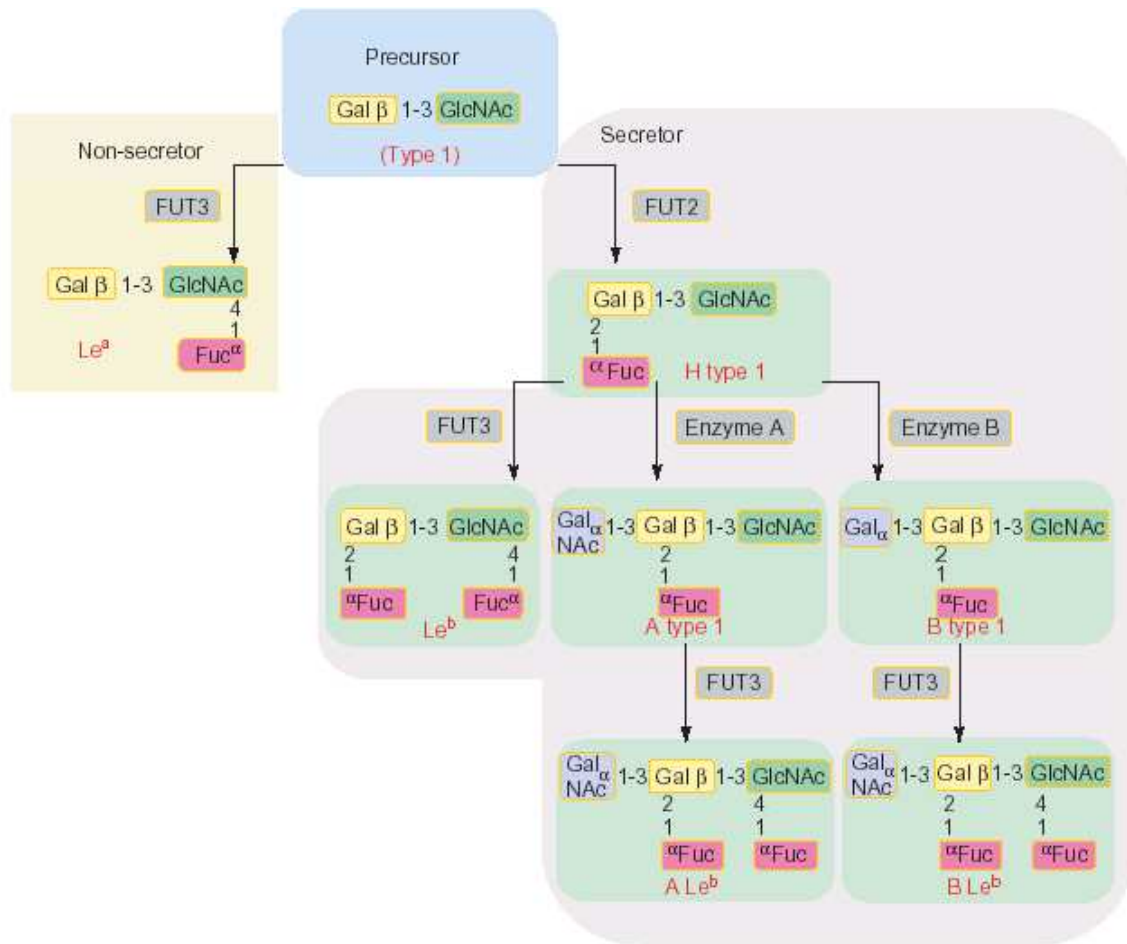


Abb. 5 Biosynthese der humanen ABH-Antigene und Lewis HBG-Antigene

Die Synthese der HBGAs beginnt mit einem Disaccharid-Vorläufer an den durch Glykosyltransferasen Monosaccharide angefügt werden. FUT3, eine α-1,3 oder α-1,4 Fukosyltransferase fügt Fukosereste (Fuc) an die α-1,3 oder α-1,4 Verbindungen des Disaccharid-Vorläufers an. Dies resultiert in einem Trisaccharid, dem Lewis Antigen (Le^a). FUT2, eine andere Fukosyltransferase fügt Fukosereste an die α-1,2 Verbindung eines Disaccharid-Vorläufers an, so dass das Trisaccharid H Typ 1 hergestellt wird. Der FUT2 Phenotyp wird als Sekretor bezeichnet, während der FUT2 inaktive Phenotyp als Nicht-Sekretor bezeichnet wird. Das weitere Anfügen von Fukoseresten an das H-Typ 1 Antigen durch das FUT3 Enzym resultiert in dem Tetrasaccharid-Antigen Lewis b (Le^b). Die Enzyme A und B stellen Glykosyltransferasen dar, die N-Acetylglucosamine (GlcNAc) oder D-Galaktose (Gal) an die α-1,3 Verbindung des H-Typ 1 anfügen, um die Tetrasaccharid-Antigene A-Typ 1 und B-Typ 1 herzustellen. Diese zwei Antigene könnten durch das Anfügen von Fukoseresten, katalysiert durch die α-1,3/4 Fukosyltransferase (FUT3), zu den Pentasaccharid-Antigenen A und B (A^{Leb} und B^{Leb}) synthetisiert werden (Tan and Jiang, 2005).

Die Bindungsspezifität an die Rezeptoren wird, wie oben erwähnt, durch das Kapsidprotein vermittelt. Dieses ist aus den Domänen P und S aufgebaut (Abb. 6). Die S-Domäne weist eine klassische β -Faltblattstruktur auf und ist hoch konserviert (Prasad *et al.*, 1999). Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Assemblierung des Virions. Die P-Domäne weist eine für Virusproteine sehr unübliche Struktur auf und ist für die Stabilisierung des Kapsids wichtig. Des Weiteren wird die P-Domäne in P1 und P2 unterteilt, wobei P2 eine hohe Sequenzvariabilität aufweist und somit eine Rolle bei der Rezeptorbindung spielt. Die Erkennung einer Norovirusinfektion durch das Immunsystem beruht wahrscheinlich ebenfalls auf der Sequenzspezifität der P2-Domäne (Prasad *et al.*, 1994; Tan *et al.*, 2003).

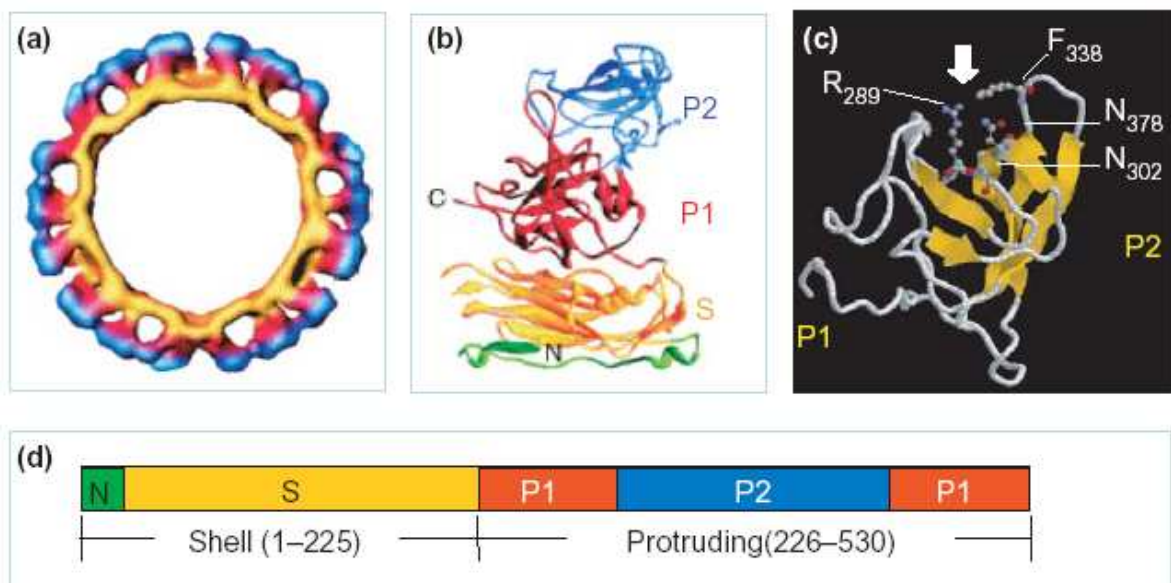


Abbildung 6: Strukturanalyse des NV-Kapsidproteins

(A) Querschnitt des NV-VLP (B) Modell der Kristallographiestruktur des Kapsidproteins (Prasad *et al.*, 1999), das aus den Domänen S (gelb), P1 (rot) und P2 (blau) aufgebaut ist. Die N-terminale Domäne ist grün dargestellt. (C) P2 Subdomäne des Kapsidproteins, das die Bindetasche mit den vier Hauptaminosäuren R_{289} , F_{338} , N_{378} und N_{302} enthält (Tan *et al.*, 2003).

(D) Skizze der Primärsequenz des NV-Kapsidproteins, ausgehend von dem N-terminalen Bereich (grün), dem sich die S Domäne (gelb) anschließt. Darauf folgt die P1 Domäne (rot), die von der P2 Domäne (blau) unterbrochen wird (Tan and Jiang, 2005).

1.5 Replikation des NV-Genoms

Das virale RNA-Genom gelangt infolge der Adsorption der Caliciviren in das Cytoplasma der Wirtszelle. Das virale RNA-Genom ist als mRNA *per se* infektiös und kann sofort durch den Translationsapparat der Wirtszelle exprimiert werden. Allerdings weist der 5'-Terminus des RNA-Genoms der *Caliciviridae* keine IRES-Sequenzen, wie z.B. die Picornaviren oder Cap-Strukturen (7-Methylguanin-Kappe), wie z. B. die Coronaviren, auf. Diese Strukturen sind normalerweise für eine regulierte Translationsinitiation bei Eukaryonten notwendig (Furuichi and Shatkin, 2000; Hellen and Sarnow, 2001). Bei den *Caliciviridae* ist das RNA-Virusgenom dagegen am 5'-Terminus mit dem VPg Protein kovalent verknüpft (Burroughs and Brown, 1978). Studien konnten zeigen, dass eine Interaktion zwischen dem VPg Protein, dem eukaryotischen Translationsfaktor 3 (eIF3) sowie der 40S-Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen stattfindet. Dies ermöglicht demnach die Rekrutierung des zellulären Translationskomplexes an die virale RNA, was die Initiation der Translation zur Folge hat (Daughenbaugh *et al.*, 2003). Während der Translation wird zunächst ein komplettes, 180 kDa großes, Polyprotein exprimiert, das die im *ORF1* kodierten, nicht-strukturellen Proteine enthält. Das Polyprotein wird kotranslational durch die viruseigene Protease (3CL^{pro}) prozessiert. Anhand von Expressionsstudien der *ORF1* Polyproteine von RHDV (Boniotti *et al.*, 1994, Wirblich *et al.*, 1995) und dem NV-Southampton (Boniotti *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Wirblich *et al.*, 1995) in *E.coli* konnte nachgewiesen werden, dass die Polyproteinprozessierung in der Freisetzung von stabilen Vorläuferproteinen, wie dem p20VPg Protein bzw. dem Vorläuferprotein 3CL^{pro}3DL^{pol} und in der Freisetzung der einzelnen aktiven Proteine p37, 2C^{NTPase}, p20, VPg, 3CL^{pro} und 3DL^{pol} resultiert. Hiermit ist die Voraussetzung für den Aufbau eines Replikationskomplexes, der die Grundlage für die Vermehrung der Caliciviren darstellt, geschaffen. Aus Studien geht hervor, dass das N-terminale Protein p37 mit zellulären Proteinen des Golgi-Apparates kolokalisiert vorliegt und eine Dissoziation des Golgi-Apparates initiiert. Dies führt zu einer Neuorganisation der Membranen, was erforderlich ist, um Membrankomplexe, die essentiell für einen funktionellen Replikationskomplex sind, zur Verfügung zu stellen (Ettayebi and Hardy, 2003; Fernandez-Vega *et al.*, 2004). Die genaue Zusammensetzung und Funktionsweise des Replikationskomplexes ist nicht bekannt. Eine Schlüsselfunktion nimmt vermutlich die RNA-abhängige RNA-Polymerase (3DL^{pol}) ein, die das positivsträngige RNA-Genom zunächst in eine Negativ-Strang-RNA umschreibt.

Voraussetzung für die NV-Replikation ist wahrscheinlich, ähnlich wie bei der Replikation des Picornavirus-Genoms, eine Uridylylierung des VPg Proteins, wobei UTPs an Tyrosinreste des VPg-Proteins angefügt werden (Paul *et al.*, 2003; Rohayem *et al.*, 2006). Sowohl bei Norovirus als auch bei den Picornaviren wird dieser Schritt durch die viruseigene $3DL^{pol}$ katalysiert. Das uridylylierte VPg Protein kann nun als Primer fungieren, indem es an den Poly-A Schwanz des 3'-Terminus der RNA bindet und hierdurch die Initiation der Replikation durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase ($3DL^{pol}$) ermöglicht (Rohayem *et al.*, 2006). Die neusynthetisierte Negativ-Strang-RNA dient als Template für die Generierung des positiv-strängigen RNA-Genoms und für die Synthese der subgenomischen RNA, die bei *Norovirus* für den *ORF2* und den *ORF3* kodiert. Zum Abschluss des Replikationszyklus lagert sich die genomische RNA gemeinsam mit den Strukturproteinen zum Virion zusammen. Dieses verlässt die Zelle und ist in der Lage, neue Wirtszellen zu infizieren. In der Abbildung 7 ist der Replikationszyklus der Noroviren zusammengefasst dargestellt.

Die Funktion der $2C^{NTPase}$, die sowohl eine NTPase Domäne (GXXGXGKS/T) als auch eine RNA-Helicase-Domäne (KXXFXSXXXXXS/TTN) in ihrer Proteinsequenz aufweist, ist bisher im Kontext der Virusreplikation nicht erforscht. In einer Studie von Pfister und Wimmer konnte lediglich gezeigt werden, dass die Norovirus $2C^{NTPase}$ NTP's hydrolysiert, bevorzugt ATP, was auf eine Funktion als Helikase hindeuten könnte. In dieser *in vitro* Studie konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass dieses Enzym die Entwindung synthetischer RNA:DNA Heteroduplexe katalysiert. Aus diesem Grund wird der $2C^{NTPase}$ eine Aktivität als Helikase bisher abgesprochen (Pfister and Wimmer, 1999).

Ebenso unbekannt ist die Funktion des Proteins p20. Es weist geringe Sequenzhomologien zu dem Poliovirus Protein 3A auf. Das Poliovirus Protein 3A spielt eine wichtige Rolle bei der Membranlokalisierung des Replikationskomplexes. Anhand von Sequenzanalysen konnten für das Norovirus Protein p20 ebenfalls hydrophobe membranspannende Domänen nachgewiesen werden (Hardy, 2005), was darauf hinweist, dass es möglicherweise eine analoge Funktion zum Poliovirus 3A Protein aufweist.

Die beiden nicht-strukturellen Proteine, die Protease $3CL^{pro}$ und die RNA-abhängige RNA Polymerase $3DL^{pol}$, werden in den folgenden Abschnitten genauer vorgestellt.

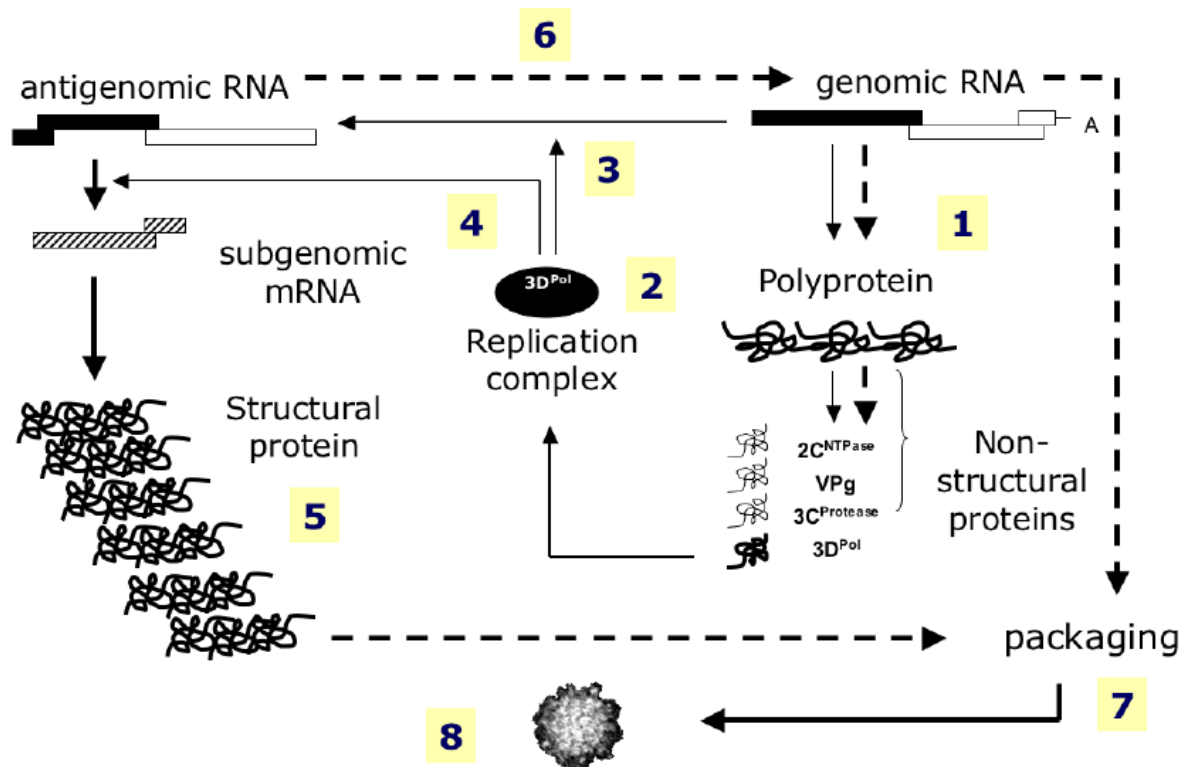


Abbildung 7: Hypothetischer Norovirus-Replikationszyklus

1. Translation des Vorläuferproteins (Polyprotein des ORF-1) im Cytoplasma **2.** Autokatalytische Spaltung des Polyproteins durch die Norovirus-3C-Protease **3.** Bereitstellung des Replikationskomplexes **4.** Replikation des Norovirus-Genoms sowie Transkription der antigenomischen und der subgenomischen RNA **5.** Translation der subgenomischen RNA in die Strukturproteine VP-1 und VP-2 **6.** Verpackung der viralen RNA und Freisetzung des Virions aus der Zelle (Rohayem, 2007).

1.6 RNA-abhängige RNA Polymerase 3D^{pol}

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-dependent RNA-Polymerase, RdRP) ist vermutlich für alle RNA Viren das Schlüsselenzym während der Replikation ihrer Genome. Eine der Aufgaben der RdRP besteht in der Synthese einer negativ orientierten RNA als Intermediat während des Replikationszyklus. Die neu generierte, negativ orientierte RNA fungiert anschließend als Template zur Transkription von subgenomischer RNA und neuer, positiv orientierter RNA-Genome. Dieser Replikationsschritt wird ebenfalls durch die RdRP katalysiert. Im Rahmen der Replikations- und Transkriptionsvorgänge in der Wirtszelle erfolgt keine RNA Synthese, bei der RNA als Template genutzt wird. Demnach liegt in der Wirtszelle auch keine RNA-abhängige RNA-Polymerase vor. Somit ist es für die RNA-Viren essentiell, dass sie für ein entsprechendes Enzym, welches im Verlauf des Infektionszyklus die Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase entfaltet, selbst kodieren.

Das Norovirusgenom kodiert für die RNA-abhängigen RNA-Polymerase 3DL^{pol}, deren Name von dem homologen Protein der *Picornaviridae* abgeleitet wurde, am 3'-Terminus des *ORF1*. Vergleichende Analysen der Aminosäuresequenz der RdRPs von Positivstrang RNA-Viren zeigten, dass die Polymerase das einzige virale Protein dieser Virusklasse ist, das hoch konservierte Motive aufweist (Hansen *et al.*, 1997). Kristallographiestudien zur Strukturanalyse der NV-3DL^{pol} schlagen eine Struktur vor, die aus drei Domänen, einer Finger (*Fingers*), einer Daumen (*Thumb*) sowie einer Handflächendomäne (*Palm*) aufgebaut ist (Abb. 8), so dass das Enzym die Form einer rechten Hand aufweist (Fullerton *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2004). Diese Struktur ist auch bei DNA-abhängigen RNA-Polymerasen, bei Reversen Transkriptasen von HIV-Type 1 sowie bei DNA-abhängigen DNA-Polymerasen vorzufinden (Canard *et al.*, 1999; Cheetham and Steitz, 1999; Ollis *et al.*, 1985). Die meisten der konservierten Motive, wie auch das aktive Zentrum, das bei der RdRP der Noroviren aus dem Aminosäuremotiv YGDD besteht, liegen in der *Palm*-Region. Der erste Aspartatrest (D) des aktiven Zentrums ist während der Replikationsinitiation für die Bindung zweiwertiger Metallionen Mg²⁺ bzw. Mn²⁺ verantwortlich (Ng *et al.*, 2004). Parallel dazu erfolgt eine Deprotonierung der 3'-Hydroxylgruppe des ersten rNTPs des RNA-Templates. Ein zweites Mg²⁺- bzw. Mn²⁺- Ion bindet an den Aspartatrest des Motivs A außerhalb des aktiven Zentrums der Polymerase. Die Bindung der Metallionen induziert eine Konformationsänderung der Polymerase, welche die Bindung der NTP's und die Initiation der RNA-Synthese ermöglicht (van Dijk *et al.*, 2004).

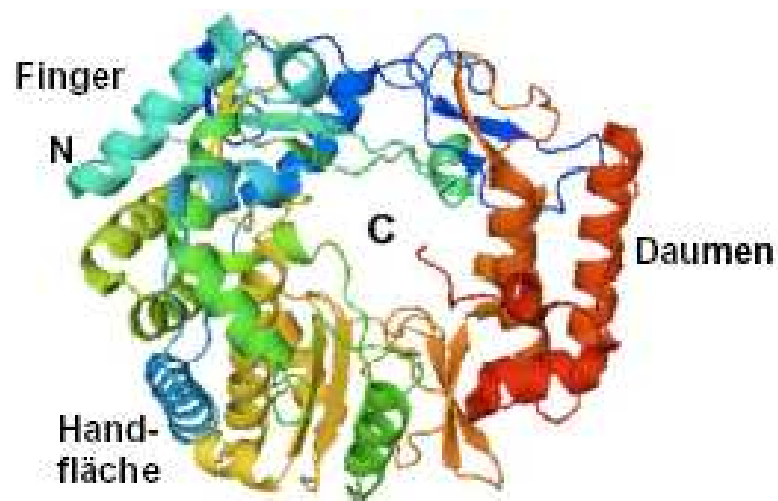


Abbildung 8: Kristallstruktur der Norovirus-3DL^{pol}
Bioinformatische Modellierung der NV-3D^{pol} Kristallstruktur des Stammes NV-GGII/4/Dresden/1997/GE. Das Enzym ist aus einer Finger (fingers) Domäne, einer Daumen (thumb) Domäne sowie der Handflächendomäne (palm) aufgebaut. Das katalytische Zentrum des Enzyms befindet sich in der Handflächendomäne (Högbom et al., 2007).

1.7 3CL-Protease der *Caliciviridae*

Die Freisetzung von aktiven Enzymen, wie z.B. von Caspasen (Procaspase-9) oder von verschiedenen Verdauungsenzymen (Chymotrypsin), setzt die Prozessierung von Vorläufer-Polypeptiden voraus (Chang *et al.*, 2003; Matrai *et al.*, 2004). Ebenso basieren die erfolgreiche Replikation sowie die Pathogenese der Caliciviren auf der spezifisch regulierten Prozessierung des *ORF1* Polyprotein-Vorläuferproteins. Im Verlauf dieses Prozessierungsschrittes werden die sechs nicht-strukturellen Proteine in ihrer aktiven Form bereitgestellt. Die Prozessierung des Polyproteins wird durch die NV- Protease (3CL^{pro}) katalysiert. Die Spaltung erfolgt dabei an spezifischen Aminosäuremotiven, wobei die Aminosäuren, die sich N-terminal vom Spaltmotiv befinden, als P1-P5 bezeichnet werden. Die Aminosäuren, die sich C-terminal vom Schnittmotiv befinden, werden als P1'-P5' gekennzeichnet (Schechter and Berger, 1967). Die NV-3CL^{pro} erkennt als Spaltmotiv in Position P1P1' zum einen das Aminosäuremotiv Glutamin/Glycin (Q/G), das sich im ORF1 zwischen dem Protein p37 und der 2C^{NTPase} sowie zwischen der 2C^{NTPase} und dem Protein p20 befindet. Zum anderen wird das Aminosäuremotiv Glutamat/Glycin (E/G) zwischen p20 und VPg sowie zwischen 3CL^{pro} und 3DL^{pol} als Spaltstelle erkannt. Als drittes Spaltmotiv wird bei NV die Aminosäuresequenz Glutamat/Alanin (E/A) zwischen dem VPg Protein und der 3CL^{pro} von der 3CL^{pro} erkannt und prozessiert (Liu *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999). Bei den verschiedenen Vertretern der *Caliciviridae* variiert die Erkennungsspezifität der 3CL^{pro}. So kommt es bei der Prozessierung des FCV Polyproteins zur Spaltung an den Aminosäuremotiven Glutamat/Alanin (E/A), Glutamat/Aspartat (E/D), Glutamat/Serin (E/S), Glutamat/Aspartat (E/D) und Glutamat/Asparagin (E/N) (Sosnovtsev *et al.*, 1998; Sosnovtsev *et al.*, 2002). Ebenso variieren die Erkennungssequenzen der 3CL^{pro} bei RHDV und SV. Des Weiteren wird vermutet, dass die 3CL^{pro} die zelluläre Translation herunterreguliert, indem es den Translationsfaktor poly (A)-Bindeprotein (PABP) spaltet (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2004). PABP spielt eine wesentliche Rolle bei der Initiation der zellulären Translation. Es bindet sowohl den Translationsinitiationsfaktor eIF4G als auch an die mRNA und ermöglicht somit eine effiziente Translationsinitiation (Gorlach *et al.*, 1994).

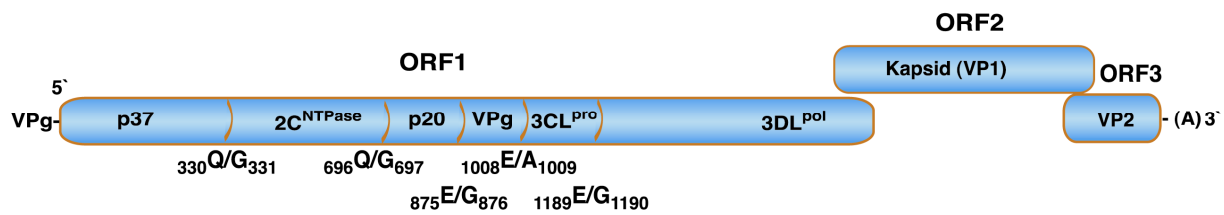


Abbildung 9: Spaltstellen innerhalb des NV-ORF1 Polyproteins

Innerhalb des von ORF1 kodierten Polyproteins erfolgt die Prozessierung an dem Spaltmotiv Q/G, das zwischen den Protein p37 und 2C^{NTPase} sowie zwischen den Proteinen 2C^{NTPase} und p20 vorliegt. Als weitere Spaltmotive werden die Sequenzen E/G, die zwischen den Proteinen p20 und VPg sowie zwischen der 3CL^{pro} und der 3DL^{pol} vorliegen, erkannt. Die Spaltung zwischen dem Protein VPg und 3CL^{pro} erfolgt an dem Aminosäuremotiv E/A.

Die Bezeichnung der 3CL-Protease der *Caliciviridae* wird abgeleitet von der 3C-Protease der *Picornaviridae*, die im viralen Genom ebenfalls am 5'-Terminus der 3DL^{pol} lokalisiert ist. Weitere gemeinsame Merkmale der Picornavirus 3C^{pro} und der NV-3CL^{pro} sind ähnliche Molekulargewichte sowie ähnliche biochemische Eigenschaften (Mosimann *et al.*, 1997; Someya *et al.*, 2002). Konsequenterweise wird die Calicivirus 3C^{pro} als 3C-ähnliche Protease (3C-like Protease; 3CL^{pro}) bezeichnet.

Die 3CL^{pro} der *Caliciviridae* ist genauso wie die bereits gut charakterisierte 3C^{pro} der *Picornaviridae* eine Chymotrypsin ähnliche Cystein-Protease (Bonioti *et al.*, 1994). Beide Proteasen weisen eine katalytische Triade auf, die aus einem Cysteinrest, dem Nukleophil des aktiven Zentrums des Enzyms, aus einem Histidinrest sowie aus einem Glutamatrest bzw. Aspartatrest aufgebaut ist. Dieser Aufbau grenzt sie von den Chymotrypsin-ähnlichen Serin-Proteasen, die Serin als Nukleophil aufweisen, ab.

Kristallographiestudien zur Strukturanalyse der NV-3CL^{pro} (Nakamura *et al.*, 2005; Zeitler *et al.*, 2006) verdeutlichten, dass das Enzym aus zwei Domänen aufgebaut ist, die durch eine Vertiefung, die die katalytische Triade beinhaltet, voneinander getrennt sind. Die Domäne 1 ist aus einer kurzen N-terminalen α -Helix aufgebaut, der sich eine gedrehte β -Faltblattstruktur anschließt. Die Domäne 2 ist aus einem sechssträngigen β -Fass aufgebaut. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Kristallographiestudie nachgewiesen werden, dass das Enzym als Dimer vorliegt (Zeitler *et al.*, 2006). In Abbildung 10 sind die Modelle der Kristallstrukturen der 3CL-Proteasen von Norovirus, von Sapovirus, von FCV, von RHDV im Vergleich dargestellt.

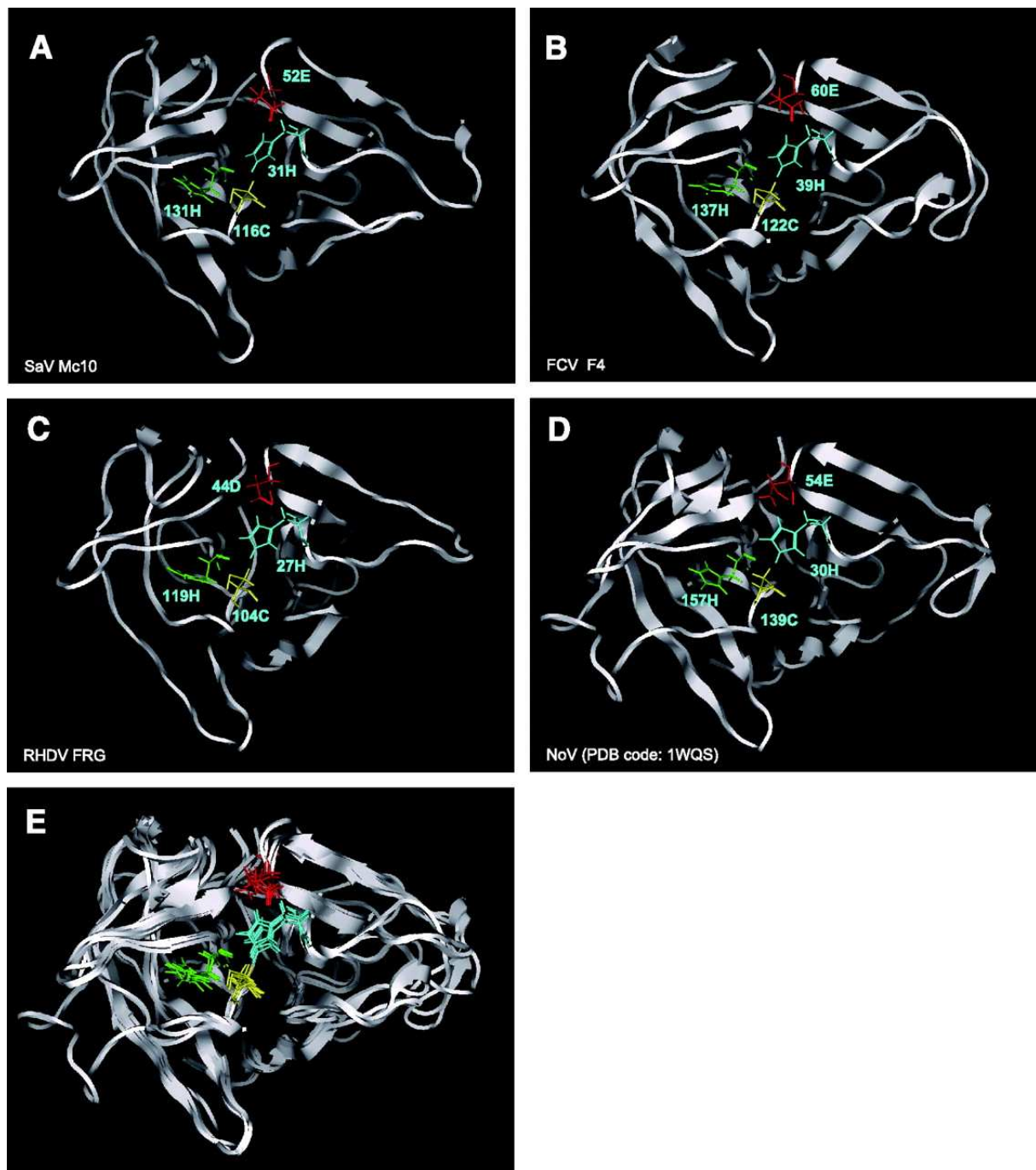


Abbildung 10: Modelle der dreidimensionalen Strukturen der Calicivirus 3CL^{pro}-Proteasen

Strukturmodelle der Sapovirus (SV)-Mc10 3CL-Protease (**A**), der feline Calicivirus (FCV) F4 3CL-Protease (**B**), der RHDV FRG 3CL-Protease (**C**) und der Norovirus Chiba 407/1987/JP 3CL-Protease (**D**). (**E**) Superimposition zum Vergleich der 3CL-Proteasen von SV-Mc10, FCV F4, RHDV FRG und NV-Chiba. Die katalytisch wichtigen Aminosäuren stellen, wie abgebildet, die Seitenketten der Aminosäuren His (blau), Glu/Asp (rot), Cys (gelb) und His (grün) dar (Nakamura et al., 2005; Oka et al., 2007)

Anhand der Strukturanalyse der NV-3CL^{pro} konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass der Cysteinrest an Aminosäureposition 139 (Cys139) im Verlauf der Substratspaltung die Funktion eines Nukleophils besitzt. Der Glutamatrest an Aminosäureposition 54 (Glu54) bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Imidazolring des Histidinrestes an Aminosäureposition 30 (His30) sowie zu einem H₂O Molekül. Dabei fungiert das Histidin als Base und das Glutamat als Anion. Die drei Aminosäuren Cys139, Glu54 und His30 bilden folglich die katalytische Triade, die für die Aktivität des Enzyms essentiell ist. In allen Vertretern des Genus *Norovirus* sind die Aminosäuren His30, Glu54 und Cys139 hoch konserviert (Abb.11).



Abbildung 11: Sequenzvergleich verschiedener NV-3CL^{pro} Sequenzen

Die Aminosäuresequenzen der 3C-Protease der Noroviren Chiba407/1987/JP, Norwalk/1968/US, MD145-12/1987/US, Camberwell/1994/AU, Hawaii/1971/US, Southampton/1991/UK und Lonsdale/1993/UK wurden miteinander verglichen. Die konservierten Aminosäurereste, His30, Glu54 und Cys139, die die katalytische Triade ausbilden, wurden rot unterlegt (Nakamura et al., 2005).

Der Spaltung eines Substrates durch die 3CL^{pro} geht zunächst die stabile Bindung des Substrates voraus, was durch eine Oxyaniontasche gewährleistet wird. In dieser bildet das Oxyanion eine Wasserstoffbrücke mit dem negativ geladenen Sauerstoffatom des Substratkohlenwasserstoffes aus (Abb. 12). Die Standard-Oxyaniontasche setzt sich aus dem Motiv Gly-Xaa-Ser/Cys-Gly zusammen. Dieses Motiv ist unter allen Serinproteasen, Serin-ähnlichen Proteasen und viralen Cystein Proteasen hoch konserviert und es stellt gemeinsam mit dem Histidinrest30 und dem Glutaminrest54 das aktive Zentrum der 3CL-Protease dar.

Bei der NV-3CL^{pro} wird die Oxyaniontasche aus den Aminosäuren Gly137-Asp138-Cys139-Gly140, die das aktive Zentrum darstellen, gebildet (Someya *et al.*, 2002). An der Substratbindung sind darüber hinaus die Aminosäuren His157, Ala160, Ile109, Arg112 und Val114 beteiligt. Diese Aminosäurereste sind als S1 Tasche klassifiziert, wobei His157 nicht nur bei den NV-3CL Proteasen strukturell konserviert ist, sondern auch bei den Picornavirus 3C-Proteasen (Nakamura *et al.*, 2005) und bei den 3C-artigen Proteasen der Coronaviren (Ziebuhr *et al.*, 1995). Mutationsanalysen haben gezeigt, dass His157 sowohl bei den *Caliciviridae* als auch bei den *Picornaviridae* eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung spielt (Blair *et al.*, 1996; Someya *et al.*, 2002).

Bisher ist der Reaktionsmechanismus der NV-3CL^{pro} nicht genau untersucht, allerdings kann aus den allgemeinen Reaktionsmechanismen für Cystein-Proteasen folgende enzymatische Reaktion abgeleitet werden (Chibale, 2002): Im Rahmen der Prozessierungsreaktion kommt es infolge der Substratbindung durch die Oxyaniontasche zunächst zu einer Konformationsänderung der 3CL^{pro}, indem His30 und Glu54 auseinander driften. Das nun positiv geladene Histidin wird durch das negativ geladene Aspartat der Seitenkette der Protease stabilisiert. Anschließend erfolgt die Deprotonierung der Thiolgruppe (R-SH) von Cys139 durch His30, wodurch das nukleophile Anion R-S⁻ entsteht. Dieses ist nun in der Lage, das Kohlenstoffatom der Peptidbindung des Substrates nukleophil anzugreifen, so dass ein tetraedrisches Zwischenprodukt gebildet wird. Infolge der Deprotonierung der Thiolgruppe des Cysteins wird auf His30 ein Proton übertragen. Dieses Proton wird auf das Stickstoffatom der Peptidbindung transferiert, wodurch diese gespalten wird. Infolgedessen kommt es zur Ausbildung einer Thioesterbindung zwischen der 3CL^{pro} und dem Rest der Peptidkette des Substrates, was in der Freisetzung des ersten Spaltproduktes resultiert. Anschließend kann die acylierte 3CL^{pro} hydrolysiert werden und ein zweites tetraedrisches Intermediat wird ausgebildet. Dieses löst sich anschließend wieder auf, wodurch das zweite Spaltprodukt freigesetzt wird und das Enzym wieder seine Ausgangskonformation einnehmen kann.

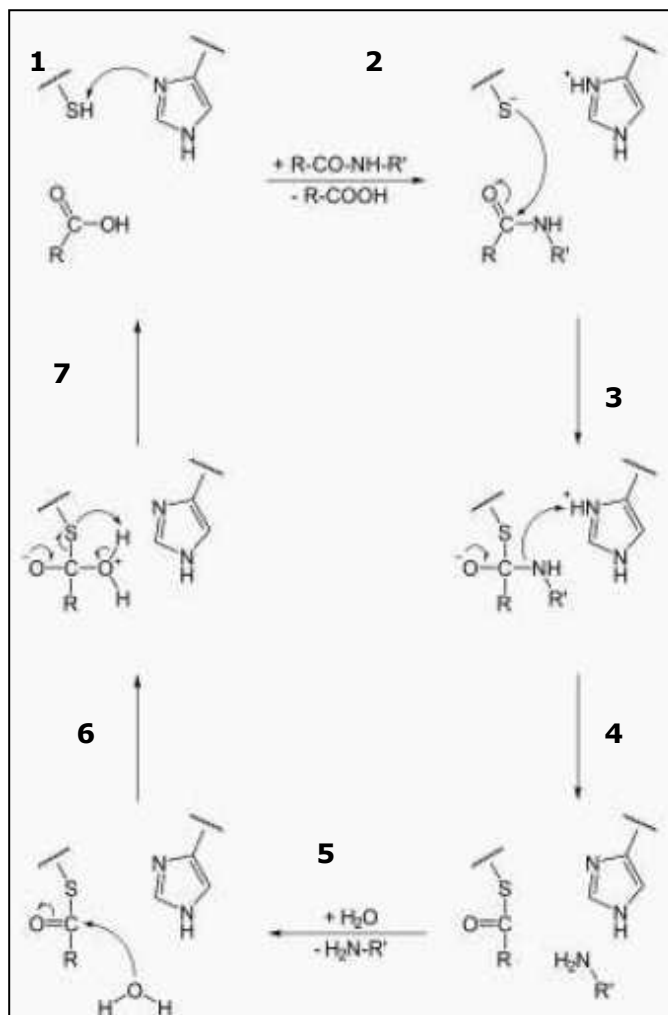


Abbildung 12: Allgemeiner Reaktionsmechanismus für Cystein-Proteasen

1: Bindung des Substrates in die Substratbindetasche der Protease und Deprotonierung des Schwefelwasserstoffes des Cys durch His, wodurch ein nukleophiles Anion entsteht. Nukleophiler Angriff auf das C-Atom der Peptidbindung, wodurch ein tetraedrisches Zwischenprodukt ausgebildet wird.

3: Protonierung des N-Atoms der Peptidbindung. **4:** Spaltung des Substrates und Freisetzung des ersten Spaltproduktes. **5:** Ausbildung einer Thioesterbindung zwischen der Protease und der restlichen Peptidkette. Hydrolyse der acylierten Protease. **6:** Ausbildung des zweiten tetraedrischen Zwischenproduktes. **7:** Auflösung des tetraedrischen Zwischenproduktes und Freisetzung des zweiten Spaltproduktes, wobei die Protease wieder ihre Ausgangskonformation einnimmt

([1]: http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine_protease).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Nach der Infektion einer Wirtszelle mit dem Norovirus ist die kotranslationale Spaltung des vom *ORF1* kodierten Polyproteins die Voraussetzung für die Replikation und Vermehrung dieser Viren. Erst infolge der Spaltung des Polyproteins können die einzelnen strukturellen und nicht-strukturellen Proteine, die für einen funktionalen Replikationskomplex absolut notwendig sind, bereitgestellt werden. Die Prozessierung des Polyproteins in die Einzelproteine wird von der viruseigenen Protease katalysiert. Dabei erfolgt die Spaltung an spezifischen Spaltnativen innerhalb des Polyproteins. Die genaue Regulation und zeitliche Abfolge der Polyproteinprozessierung ist bisher allerdings nicht bekannt. Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass das Polyprotein differentiell und sequentiell, in Abhängigkeit von *cis*- und *trans*-Aktivitäten der viruseigenen 3CL^{pro}, prozessiert wird. Dies würde sowohl die Freisetzung von Vorläuferproteinen als auch eine zeitlich regulierte Freisetzung der verschiedenen strukturellen und nicht-strukturellen Einzelproteine aus dem Polyprotein ermöglichen. Zur Untersuchung dieser Hypothese soll zunächst ein NV-Volle-Länge cDNA-Klon generiert werden, der die komplette Genom-Sequenz des Norovirus Genotyp II Dresden/1997/GE kodiert. Dieser NV-Volle-Länge cDNA Klon wird als Grundlage für die Generierung von NV-Vorläuferproteinen dienen, die die Sequenz der 3CL-Protease enthalten. Für die Untersuchung der Prozessierung des Polyproteins *in cis* soll das Vorläuferprotein $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ generiert werden, das die komplette 3CL^{pro} Sequenz enthält. Die NV-3CL^{pro} wird in diesem Vorläuferprotein von dem Spaltnativ des VPg-Proteins und von den N-terminalen Sequenzen der 3DL^{pol} flankiert.

Die Prozessierung des ORF1-Polyproteins ist nicht nur von der *cis*-Aktivität der 3CL^{pro} abhängig sondern auch durch eine *trans*-Aktivität dieses Enzyms. Anhand von Peptiden, die die authentischen Spaltnative innerhalb des NV-Polyproteins präsentieren, soll die *trans*-Aktivität eines zuvor aufgereinigten 3CL^{pro} Fragmentes charakterisiert werden. Berechnungen von Spalteffizienzen der 3CL^{pro} an den unterschiedlichen Spaltnativen sollen Aussagen über die Substratspezifität der 3CL^{pro} ermöglichen.

Des weiteren ist bekannt, dass nicht nur die 3CL^{pro} allein proteolytisch aktiv ist, sondern auch ihr Vorläuferprotein 3CL^{pro}3DL^{pol} (Belliot *et al.*, 2003). Allerdings ist nicht bekannt, ob sich die Spaltspezifitäten dieser beiden Proteine unterscheiden. Diese Fragestellung führt zur Aufstellung der zweiten Hypothese dieser Arbeit, welche besagt, dass 3CL^{pro} und 3CL^{pro}3DL^{pol} Spezifitätsunterschiede in ihrer Aktivität aufweisen könnten, die zu einer sequentiellen und differentiellen Spaltung des Polyproteins beitragen.

Um diese These zu untersuchen, soll ebenfalls die *trans*-Aktivität eines aufgereinigten 3CL^{pro}3DL^{pol} Vorläuferproteins untersucht werden. Durch Berechnungen zur relativen Spalteffizienz von 3CL^{pro} und 3CL^{pro}3DL^{pol} sollen Aussagen über die Substratspezifitätsunterschiede beider Enzyme gemacht werden.

Auf der Aktivität der 3CL^{pro} basiert der initiale Schritt der Virusreplikation. Demzufolge hätte eine Inhibierung der 3CL^{pro} die Arretierung der kompletten Norovirusreplikation zur Folge. Durch die Gabe geeigneter 3CL^{pro}-Inhibitoren könnte folglich eine Neuinfektion von Zellen verhindert werden. Aus diesem Grund sollen im Rahmen dieser Arbeit sechs verschiedene chemische Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der 3CL^{pro} Aktivität getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresesystem	Sub-Cell GT	BIORAD
Analysenwaage		FAUST
Bioimager	LAS-3000	FUJIFILM
Blockthermostat		STUART SCIENTIFIC
Brutschrank - CO ₂ begast		HERAEUS
Digital Printer	P91	MITSUBISHI
DNA-Sequenzierer		APPLIED BIOSYSTEMS GELDO
Durchlichtmikroskop	Axiovert 25	ZEISS
FPLC Anlage	ÄKTAprime plus	AMERSHAM BIOSCIENCES
Geldokumentationssystem	GelDoc 2000	BIORAD
HPLC Anlage	ÄKTA purifier	AMERSHAM BIOSCIENCES
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 9700	APPLIED BIOSYSTEMS
pH-Messgerät	Seven Easy	METTLER TOLEDO GMBH
Phosphorimager	FLA-2000	FUJIFILM
Photometer	Biophotometer	EPPENDORF
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem	Mighty Small II	HOEFER
Power Supply	EPS 600	PHARMACIA BIOTECH
Schüttelinkubator	Classic Series	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
Schwenktisch	DuoMax1030	HEIDOLPH
Semi-dry-Blotter	V20-SDB	CHRIST
Sterilbank	Clean Air	HERAUS
Thermoschüttler	Thermomixer compact	EPPENDORF
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417C	EPPENDORF
Ultraschallgerät	Sonifier 250	BRANSON
Ultrazentrifuge	OptimaLE-80K	BECKMANN-COULTER
Vakuum-Konzentrator	RVC2-18	CHRIST

Gerät	Modell	Hersteller
Vortexer	Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Wasserbad		MEMMERT
Zentrifuge	AvantiJ-20	BECKMANN-COULTER

2.1.2 Chemikalien/Reagenzien

Wenn nicht gesondert angegeben, wurden Chemikalien von folgenden Firmen verwendet:

GIBCO BRL (Gaithersburg, USA); FLUKA AG (Buchs, CH); SERVA (Heidelberg, D); SIGMA (St. Louis, USA); Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe, D); MERCK KG (Darmstadt, D);

2.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Herculase Polymerase	STRATAGENE
<i>Pfu</i> -Polymerase	PROMEGA
Go Taq® Flexi DNA Polymerase	PROMEGA
Restriktionsendonukleasen	MBI- FERMENTAS, NEW ENGLAND BIOLABS
T4-DNA-Ligase	PROMEGA
Trypsin-EDTA	DULBECCO

2.1.4 Feinchemikalien/Materialien

Reagenz	Hersteller
[S ³⁵]Methionin	HARTMANN ANALYTIC
Acetonitril	MERCK
Acrylamid/Bisacrylamid Gel A 30%	ROTH
Acrylamid/Bisacrylamid Gel B 2 %	ROTH
Agar	ICN
Agarose	CAMBREX
Aluminium Oxyd	SIGMA
Amoniumsulfat	ROTH
Ampicillin	ROTH
APS	APPLICHEM
β-Mercaptoethanol	ROTH

Reagenz	Hersteller
Bromphenolblau	SIGMA
Coomassie [®] Brillantblau G250	SIGMA
Dithiothreitol	SIGMA
Dialyseschlauch	SIGMA
dNTP-Mix (10 mM)	PROMEGA
ECL ^{plus} -System TM	AMERSHAM PHARMACIA BIOSCIENCES
Ethidiumbromid	ROTH
Fetales Kälberserum (FKS))	INVITROGEN
GPC column HiLoad 16/60 Superdex 75pg	GE HEALTHCARE
H ₂ O ultrapure	MERCK
HisTrap TM FF crud	GE HEALTHCARE
HiTrap TM SP FF 5 ml column	GE HEALTHCARE
Hybond Nitrocellulose Filter	AMERSHAM BIOSCIENCES
Imidazol	ROTH
IPTG	ROTH
Kanamycin	ROTH
LB Broth Base	INVITROGEN
Magermilchpulver	LASANA
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	ROTH
O`Gene Ruler 1kb DNA Ladder	FERMENTAS
PBS	DULBECCO
Pistill/Mörser	SIGMA
Polyfect [®] Transfection Reagent	QIAGEN
Proteinase-Inhibitor-Cocktail III	CALBIOCHEM
ProteinLadder Page Ruler Prestained	FERMENTAS
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	INVITROGEN
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AMERSHAM BIOSCIENCES
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	ROTH
Tri-Flour-Esseigsäure (TFA)	MERCK
Triton [®] X-100	FERAK LABORAT GMBH
Tween [®] 20	SERVA
YMC-Pack ODS-AQ column	YMC EUROPE

2.1.5 Kit-Systeme

Kit	Hersteller
ABI PRISM® Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	PE APPLIED BIOSYSTEMS
BCA™ Protein Assay Kit	PIERCE
DyeEX™ 2.0 Spin-Kit	QIAGEN
Fast Link™ Ligation Kit	EPICENTRE BIOTECHNOLOGIE
MinElute™ Gel Extraction Kit	QIAGEN
PROTEINSCRIPT™ T7	AMBION
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAshredder®	QIAGEN
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	STRATAGENE
TOPO® XL PCR Cloning Kit	INVITROGEN
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	INVITROGEN

2.1.6 Antikörper

Antikörper primär	Bezugsquelle	eingesetzte Verdünnung in Westernblotanalyse	
		prokaryotisch	eukaryotisch
mouse-anti-pentaHis (monoclonal)	QIAGEN	1:5000	1:5000
rabbit-anti-NV-3CL (polyclonal)	CALICILAB, INSTITUT FÜR VIROLOGIE, TU-DRESDEN	1:50000	1:8000
rabbit-anti-NV-3DL (polyclonal)	EUROGENTEC	1:1000	1:200
rabbit-anti-NV-Kapsid (polyclonal)	EUROGENTEC	-	1:1000

Antikörper sekundär	Bezugsquelle	Eingesetzte Verdünnung in Westernblotanalyse
goat-anti-mouse, HR-Peroxidase-gekoppelt	SIGMA	1:5000
sheep-anti-rabbit, HR-Peroxidase-gekoppelt	SIGMA	1:5000
Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 1x PBS/1%Tween20 + 5 % (w/v) Magermilchpulver.		

2.1.7 Primer

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma BIOMERS bezogen.

	Primer	Primersequenz 5' → 3'	Verwendung
1	333-ORF1(A)-for	GTGAATGAWGATGGCGTC	Amplifizierung des NV-ORF1 Fragment A
2	334-ORF1(A)-rev	GATCTCACCATAGCCAGCTC	
3	335-Nor-ORF1(B)-for	CCTTGGYGCRCTACGGRCGG	Amplifizierung des NV-ORF1 Fragment B
4	338-Nor-ORF1(B)-rev	CATYTGRCKCCMACAGTRC	
5	339-Nor-ORF1(C)-for	CGARTTYTGYCGCTTGAGG	Amplifizierung des NV-ORF1 Fragment C
6	340-Nor-ORF1(C)-rev	TRTAYCTGGARTGYCTCTCR	
7	320-Nor-ORF1-for	GCACACTGTGTTACACTTCC	Amplifizierung des NV-ORF1 Fragment D1
8	321-Nor-ORF1(D1)-rev	ACATTGGCTCTTGTCTGG	
9	322-Nor-ORF2/3(D2)-for	GCAGAAGACCTCTATCTCC	Amplifizierung des NV-ORF2/3 Fragment D2
10	327-Nor-ORF2/3(D2)-rev	TCTTTATCATGTTGGAAAGAAGC	
11	389-Nor-ORF3(E)-for	TCATGACGTCGTAGCAACCTACAACAGGCTTC	Amplifizierung des NV-ORF 3 Fragment E
12	391-Nor-ORF3(E)-rev	TCAGACTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	

	Primer	Primersequenz 5' → 3'	Verwendung
13	91-Nor-ABC-for	CCCCGAGACGTCAGCGGGTGAATGAAGA TGGCGTCTAACGACGCTTCCGCT	Amplifizierung des Fragmentes ABC
14	102-Nor-D1-OVC-rev	ATATTTGTACCTGGAATGCCTCTCGAAGA TGATCGAACCCTCCTCA	
15	100-Nor-D1-OVC-for	CCATGATCCGGTGCCTCGAGCATTCGG AGGCTTAATGGATGAACTCAAAACACACT <i>GTGTTACACTTCCTATCAGAGTTGGTATGAA</i> <i>TA</i>	Amplifizierung des Fragmentes D1D2E
12	391-Nor-ORF3(E)-rev	TCAGACTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT T	
16	144-Nor-Orf1- <i>Eco47III</i> -for	GCTAGCGCTTGGACCACCATGAAGATGG CGTCTAACGACGCTTCCGCT	Klonierung der NV-VLcDNA in pIRES
17	145-Nor-Orf3- <i>NotI</i> -rev	CTAGCGGCCGCGTATTTAAAAGACACTA AAGAATGGAA	
18	303-Nor-VPg3C3D- <i>EcoRV</i> -for	CGATATCATGGAGGCCAAGATTCGGCAA AGGATTT	Klonierung von <i>ΔVPG3CL3DL</i> in pIRES
19	304-Nor-Vpg3C3D- <i>NotI</i> -rev	GGACGCGGCCGCGTGGTGGTGGTGGTGG TGCTCGAGTTGTTGCAATGAAGGGCCAC CCTTGACTC	
20	101-Nor-3C- <i>NcoI</i> -for	GATACCATGGCAAGAAAACCTCAGTTTTG AG	Klonierung von <i>ΔVPG3CL3DL</i> in pET28b
21	98-Nor-3C3D- <i>XhoI</i> -rev	CCTCTCGAGCGATTGTTGCAATGAAGGG C	
22	240-Nor-VPg3C3D- <i>SalI</i> -for	GGCGTCGACATTCGGCAAAGGATTTTCA GG	Klonierung von <i>ΔVPG3CL3DL</i> in pET28b
23	168-Nor-VPg3C3D- <i>NotI</i> -rev	GCGTATCGGCGGCCGCGGATTTCGACGCC ATCTTCATTCAC	
24	185-Nor-ORF1- <i>SalI</i> -for	GACGCGTCGACTCCATGAAGATGGCGTC TAACGACGCTTCCGCT	Klonierung von <i>ORF1</i> in pET28b
25	186-Nor-ORF1- <i>NotI</i> -rev	CGGTAAAGCGGCCGCGGATTTCGACGCCA TCTTCATTCACA	
26	101-Nor-3C- <i>NcoI</i> -for	GATACCATGGCAAGAAAACCTCAGTTTTG AG	Klonierung von <i>3CL</i> in pET28b
27	96-Nor-3C- <i>XhoI</i> -rev	CCTCTCGAGCGATTCAAGTGTAGCCTCCC CCT	

	Primer	Primersequenz 5' → 3'	Verwendung
28	66-Nor-3D- <i>NcoI</i> -for	CATGCCATGGGTGGTGACAGTAAGG	Klonierung von 3DL in pET28b
29	56-Nor-3D- <i>Sall</i> -rev	ACGCGTCGACTTCGACGCCATCTTCAT	
30	461-p20vpg-rev- <i>Bam</i> HI	CGGATCCGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTC AAAACTGAGTTTCTCATTGT	Klonierung von p20VPg in pET28b
31	173-Nor-VPg- <i>Hind</i> III-rev	CATAAGCTTCTCAAACTGAGTTTCTCAT TGTAGTC	
32	230-Nor-3C-for	CCACACCAGGTGACGCTGGCTGCCCCTA CATCTAC	Mutation C ₁₃₉ A
33	231-Nor-3C-rev	GTAGATGTAGGGGCAGCCAGCGTCACCT GGTGTGG	
34	250-Nor-3C3D-for	GGGGAGGCTACACTTGCAGGTGGTGACA GTAAGGGA	Mutation E ₁₁₈₉ A
35	251-Nor3C3D-rev	TCCCTTACTGTCACCACCTGCAAGTGTAG CCTCCCC	
36	460-Nor-p20vpg-for- <i>Nhe</i> I	CGTAGCTAGCATGGGCCCAGCTCTCACC ACCTTCAAC	Klonierung von p20VPg in pIRES
37	461-p20vpg-rev- <i>Bam</i> HI	CGGATCCGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTC AAAACTGAGTTTCTCATTGT	
38	M13-for	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierungs- primer
39	M13-rev	CAGGAAACAGCTATGA	Sequenzierungs- primer
40	T7-for	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierungs- primer
41	T7-rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierungs- primer
42	431-Nor-ORF1-for	TTCCTGTGTGCTCTGTCTTCACTATTC	Sequenzierungs- primer
43	362-Nor-ORF1-for	CCTCAGATTGCAAGAACTCG	Sequenzierungs- primer
44	337-Nor-ORF1-for	GGCGTCATGAARACYCTCAC	Sequenzierungs- primer
45	434-Nor-ORF1-for	GAATATCTCAATCAAGAGGTGCC	Sequenzierungs- primer
46	436-Nor-ORF1-for	CGGTTTAGTCACAGGTTCTG	Sequenzierungs- primer

	Primer	Primersequenz 5`-3`	Verwendung
47	338-Nor-ORF1-rev	CATYTGRCKCCMACAGTRC	Sequenzierungs-primer
48	396-Nor-ORF1-for	CCACATGCGGAAAAACG	Sequenzierungs-primer
49	41-NOR-ORF2-rev	CGTGAGGACTCGACAAGAGA	Sequenzierungs-primer
50	15-NOR-ORF1-for	CCAGACAAGAGCCAATGTTC	Sequenzierungs-primer
51	394-NOR-ORF2-for	CAAACAATGATTTTCAAACG	Sequenzierungs-primer
52	440-NOR-ORF2-for	GGGGATGATGTCTTCACAGTCTCTTGTC	Sequenzierungs-primer
53	119-NOR-ORF1-for	TGTGGGATGGAGAGATCTACCATT	Sequenzierungs-primer
54	120-NOR-ORF1-for	TCGCAGCCTCCCTCACAGGAGAC	Sequenzierungs-primer
55	121-NOR-ORF1-for	AAATTCTGGAGATCGTCCACAA	Sequenzierungs-primer
56	122-NOR-ORF1-for	CTCAGAACCACATTTGGCTCA	Sequenzierungs-primer

Tabelle 1: Klonierungsprimer, in vitro Mutageneseprimer, sowie Sequenzierungsprimer
Unterstrichene Nukleotidsequenzen zeigen Erkennungssequenzen für Typ II-Restriktionsendonukleasen. Kursiv dargestellte Basenfolgen stellen überhängende Sequenzen dar. Die degenerierten Nukleotide unterliegen folgender Codierung: W=A+T; Y=C+T; R=A+G; K=G+T; M=A+C

2.1.8 Vektoren

Vektor	Genetischer Marker	Hersteller
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Amp ^r /Kan ^r , <i>LacZ</i> α ORF, <i>T7</i> -Promotor, MCS, f1ori, pUCori	INVITROGEN
pCR [®] 4Blunt-TOPO [®]	<i>CcdB</i> Gen, Kan ^r /Amp ^r , <i>T7</i> -Promotor, <i>Lac</i> -Promotor, <i>LacZ</i> α ORF, TOPO [®] cloning site, pUCori	INVITROGEN
pCR [®] -XL-TOPO	<i>CcdB</i> Gen, Kan ^r /Zeo ^r , <i>T7</i> -Promotor, <i>Lac</i> -Promotor, <i>LacZ</i> α ORF, TOPO [®] cloning site, pUCori	INVITROGEN
pIRESneo3	Amp ^r /Neo ^r , <i>T7</i> -Promotor, <i>CMV</i> -Promotor, MCS, IVS, IRES-ECMV, ColE1ori, SV40polyA	BD BIOSCIENCES
pET28b	Kan ^r , <i>T7</i> -Promotor, <i>lacI</i> , MCS, 6xHisTag N- und C-Terminal, <i>T7</i> Tag, pBR322ori, f1ori	NOVAGEN

2.1.9 Rekombinante Plasmide

Plasmid	Insert	Nukleotidposition im Genom des Stammes NV-GGII/4/Dresden/1997/GE
pJRNORII-ACRTOPO	$\Delta ORF1$	1-1214
pJRNORII-BCRTOPO	$\Delta ORF1$	1126-3381
pJRNORII-CCRTOPO	$\Delta ORF1$	3186-4276
pJRNORII-D1CRTOPO	$\Delta ORF1$	4190-5011
pJRNORII-D2CRTOPO	$\Delta ORF1$	4396-6887
pJRNORII-ECRTOPO	$\Delta ORF1$	6848-7578
pUSNORII-ABCBluntIITOP	$\Delta ORF1$	1-4291
pUSNORII-D1D2EBluntIITOP	$\Delta ORF1$	4152-7578

Plasmid	Insert	Nukleotidposition im Genom des Stammes NV-GGII/4/Dresden/1997/GE
pUSNORII-D1D2EBIuntIITOPO	<i>ΔORF1</i>	4152-7578
pUSNORII-VLXLTOPO	VLcDNA	1-7578
pUSNORII-VLIRES	VLcDNA	1-7558
pUS-NORII-ORF1ET28b	<i>ORF16xHis</i>	1-5100
pUS-NORII-ORF1 μ_{C139A} ET28b	μ_{C139A} <i>ORF16xHis</i>	1-5100
pUS-NORII-3CL ^{pro} ET28b	<i>3CL^{pro}</i>	3012-3567
pUS-NORII-ΔVPg3CL ^{pro} Δ3D ^{pol} ET28b	<i>VPg3CL^{pro}3DL^{pol}6xHis</i>	3012-3750
pUS-NORII-ΔVPg μ 3CL ^{pro} Δ μ 3DL ^{pol} ET28b	<i>VPg3CL^{pro}μ_{C139A}3DL^{pol}6xHis</i>	3012-3750
pUS-NORII-ΔVPg3CL ^{pro} Δ3DL ^{pol} ET28b	<i>VPg3CL^{pro}μ_{E1189A}3DL^{pol}6xHis</i>	3012-3750
pUS-NORII-ΔVPg3CL ^{pro} Δ3DL ^{pol} IRES	<i>VPg3CL^{pro}3DL^{pol}6xHis</i>	2841-3750
pUS-NORII-ΔVPg μ 3CL ^{pro} Δ3DL ^{pol} IRES	<i>VPg3CL^{pro}μ_{C139A}3DL^{pol}6xHis</i>	2841-3750
pUS-NORII-ΔVPg3CL ^{pro} 3DL ^{pol} ET28b	<i>6xHisVPg3CL^{pro}3DL^{pol}6xHis</i>	2850-5097
pUS-NORII-ΔVPg3CL ^{pro} μ 3D ^{pol} ET28b	<i>6xHisVPg3CL^{pro}μ_{E1189A}3DL^{pol}6xHis</i>	2850-5097
pUS-NORIIp20VPgIRES	<i>p20VPg6xHis</i>	2091-3024
pUS-NORIIp20VPgET28b	<i>p20VPg</i>	2091-3024

Tabelle 2: Auflistung der Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden

In der linken Spalte ist der Name des NV-Plasmids aufgeführt, auf den sich im weiteren Verlauf der Arbeit bezogen wird. In der mittleren Spalte ist das resultierende NV-Gen aufgelistet. In der rechten Spalte wurden die Nukleotidpositionen der Inserts innerhalb des Genoms des Stammes NV-GGII/4/Dresden/1997/GE dargestellt.

2.1.10 Peptide

Peptidname	Aminosäuresequenz 5`-3`
	P4 P3 P2 P1 P1`P2`P3`P4`
p37/2C ^{NTPase}	L L G D Y E L Q * G P E D L A V
2C ^{NTPase} /p20	R L D E F E L Q * G P A L T T F
p20/VPg	S S D D I K T E * G K K G A N K
p20/VPgμTP2L	S S D D I K L E * G K K G A N K
VPg/3CL ^{pro}	Y N E K L S F E * A P P S I W
3CL ^{pro} /3DL ^{pol}	G E A T L E * G G D S K G
3CL ^{pro} /3DL ^{pol} μTP3E	G E A E L E * G G D S K G

Tabelle 3: Auflistung der Peptide, die für trans-Spaltungsassays verwendet wurden

In der linken Spalte ist der Peptidname aufgeführt, der sich auf das Spaltmotiv zwischen den Proteinen im Polyprotein bezieht. Die Peptide wurden bei Invitrogen synthetisiert und durch reversed-phase-Chromatographie mit Hilfe der HPLC aufgereinigt. In der rechten Spalte ist die Aminosäuresequenz des Peptides in 5`-3`-Orientierung dargestellt. Das Spaltmotiv wird als P1P1` bezeichnet. Die Aminosäuren, die sich N-terminal von der Spaltstelle befinden, werden als P2-P4 gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die sich C-terminal von der Spaltstelle befinden, werden als P2`-P4` bezeichnet. Mutierte Aminosäuren sind **rot** unterlegt.

2.1.11 Inhibitoren

Substanz	Hersteller
CMK (Chloromethyl ketone inhibitor)	CALBIOCHEM
α-MAPI (anti-microbial alkaline protease inhibitor)	CALBIOCHEM
XP-10	UNIVERSITÄT LÜBECK, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE
XP-17	UNIVERSITÄT LÜBECK, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE
XP-40	UNIVERSITÄT LÜBECK, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE
XP-41	UNIVERSITÄT LÜBECK, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

2.1.12 *E.coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
DH5 α	ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	INVITROGEN
One Shot® TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	INVITROGEN
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q <i>Z</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (Tet ^r)]	STRATAGENE
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>dcm</i> ⁺ , <i>hsdS</i> β (r_β - m_β -) <i>gal</i> , (DE3), (Tet ^r) <i>endA</i> , <i>tonA</i>	NOVAGEN

2.1.13 Eukaryotische Zellen

Stamm	Charakteristika	Hersteller
293T-Zellen	humane embryonale Nierenendothelzellen	ATCC-CRL-11268 TM

2.1.14 Medien

2.1.14.1 Bakterienkulturmedien

LB flüssig	LB Agar	SOC Medium
2% LB Broth Base	0,5 % (w/v) Hefeextrakt	2 % Trypton
1,0 % (w/v) NaCl	1,0 % (w/v) Trypton	0,5 % Hefeextrakt
	10 mM NaCl	10 mM NaCl
	2,0 % (w/v) Agar	2,5 mM KCl
		10 mM MgCl ₂
		10 mM MgSO ₄
		20 mM Glucose

Alle Medien wurden nach der Herstellung autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden entweder 100 mg/l Ampicillin oder 30 mg/l Kanamycin hinzugegeben. Die Inkubation der inokulierten Medien erfolgte bei 37 °C.

2.1.14.2 Zellkulturmedien

Das zur Kultivierung von 293T-Zellen verwendete Medium wurde von der Firma Gibco BRL (LifeTechnologiesTM) bezogen. Dabei handelt es sich um DULBECCO's modifiziertes Eagle Medium (1x DMEM) mit 4.500 mg/l D-Glucose („High Glucose“) [Katalog-Nr.:10938] mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und 1 % (w/v) Glutamin (Komplettmedium).

2.1.15 Puffer und Lösungen

2.1.15.1 Agarose Gelelektrophorese

TAE- Puffer:	40 mM	TRIS-Base, pH 8,0
	1 mM	EDTA
	20 mM	Essigsäure
6x DNA Ladepuffer:	30 %	Glycerol
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
Ethidiumbromid:	10 mg/ ml	

2.1.15.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamidlösung:	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bisacrylamid
APS-Lösung:	10 %	Ammoniumperoxodisulfat
4 x Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris-HCl (pH 8,8)
4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris-HCl (pH 6,8)
	350 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Probenpuffer (6 x):	10,28 %	SDS
	36 %	Glycerol
	5 %	β -Mercaptoethanol
	0,012 %	Bromphenolblau
5 x Laufpuffer:	25 mM	Tris base
	192 mM	Glycine
	0,1 %	SDS
		<i>ad 1 l dest. H₂O</i>
Coomassie [®] Brillantblau:	42 %	Methanol
G250-Färbelösung:	17 %	Essigsäure
	0,1 %	Brillantblau G250
Entfärbelösung:	5 %	Methanol
	5 %	Essigsäure

2.1.15.3 Western Blot

1 x Transferpuffer (1 l):	25 mM	Tris-Base
	190 mM	Glycin
	0,01 %	SDS
	10 %	Methanol (pH 8,3-8,4)
		ad. 1 l dest. H ₂ O
PBS:	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	2,7 mM	KCl
	6,5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	137 mM	NaCl
Waschpuffer:		PBS pH 7,4
	0,2 %	Tween 20
Blockierungslösung:	5 %	Magermilchpulver
	0,2 %	Tween 20

2.1.15.4 Proteinaufreinigung

2.1.15.4.1 Resuspensionspuffer:

3CL ^{pro} -Puffer:	40 mM	Tris-Base
	150 mM	NaCl
	2 mM	DTT
		pH 7,25
3CL ^{pro} _{μE1189A} 3DL ^{pol} -Puffer:	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	150 mM	NaCl
	2 mM	DTT
		pH 7,0

2.1.15.4.2 Ni-Affinitätschromatographie

Bindungspuffer:	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	500 mM	NaCl
	30 mM	Imidazol
		pH 7,2
Elutionspuffer:	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	500 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
		pH 7,2

2.1.15.4.3 Kationenaustauschchromatographie

Dialysepuffer/Bindepuffer:	20 mM	TRIS
	1 mM	DTT
		pH 7,25
Elutionspuffer:	20 mM	TRIS
	1 M	NaCl
	2 mM	DTT
		pH 7,25

2.1.15.4.4 Reverse Phase Chromatographie (HPLC)

Lösung A:	0,1 %	TFA
	100 %	H ₂ O ultrapure
Lösung B:	65 %	Acetonitril
	35 %	H ₂ O ultrapure
	0,1 %	TFA

2.1.16 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

TJB1:	30 mM	Kaliumacetat
	100 mM	RbCl
	10 mM	CaCl ₂
	50 mM	MnCl ₂
		in 300 ml H ₂ O lösen
		ad 75 ml Glycerin
		pH 5,8 mit Essig-
		säure einstellen

TJB2:	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	RbCl
		in 50 ml H ₂ O lösen
		ad 15 ml Glycerin
		pH 6,5 mit NaOH
		einstellen
		auf 100 ml mit H ₂ O
		auffüllen

2.1.17 Lyse eukaryontischer Zellen

Lysispuffer :	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	140 mM	NaCl
	0,025 %	NaN ₃
	1 %	Triton-X100

2.2 Methoden

2.2.1 Amplifikation von cDNA- Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

2.2.1.1 Standard-PCR

Die für die Amplifizierung der gewünschten cDNA Bereiche verwendeten Oligonukleotidprimer sind unter 2.1.7 beschrieben. Die PCR-Reaktionsansätze setzten sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Komponenten	Eingesetztes Volumen (µl)
Puffer (10x)	5
DMSO (3%)	1,5
Template (100 ng)	X
dNTP Mix (10 mM) (dATP; dCTP; dGTP; dTTP)	3
forward-Primer (10 pmol/µl)	5
reverse-Primer (10 pmol/µl)	5
Herkulase®-Polymerase(5 U/µl)	1
	auf 50 µl mit H ₂ O auffüllen

Die PCRs wurden in 200 µl Reaktionsgefäßen unter Verwendung eines Thermocyclers folgendermaßen durchgeführt:

1 min	95°C	Initialdenaturierung	1 Zyklus
30 sec	95°C	Denaturierung	} 30 Zyklen
30 sec	60°C	Annealing	
1-8 min, je nach Länge des Amplifikates (**)	68°C	Extension	
5 min, je nach Länge des Amplifikates (**)	68°C	Extension	1 Zyklus

(*) Die Annealing-Temperatur läßt sich näherungsweise nach folgender Formel berechnen:

$$T_m = 69,4^\circ\text{C} + 0,41 \times \text{GC \%} - 650/\text{PL} - 6^\circ\text{C}$$

GC: Anteil der Basen Guanin und Cytosin an der komplementären Sequenz zwischen Template und Primer in Prozent

PL: Länge der komplementären Sequenz zwischen Template und Primer

(**) Die Syntheserate der Herkulase®-Polymerase beträgt etwa 1000 Nukleotide/Minute

Für alle PCR-Schritte wurde das Herkulase[®] Polymerase Gemisch verwendet, das aus der *Taq*-Polymerase und der *Pfu*-Polymerase, die eine 3'-5'-*proof-reading*-Exonuclease Aktivität aufweist, besteht.

2.2.1.2 Overlap-Extension-PCR (Pogulis *et al.*, 1996)

Die Overlap-Extension-PCR ist geeignet, um DNA-Fragmente ohne Verwendung von Schnittstellen zu fusionieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um das NV-Volle-Länge cDNA-Genom zu generieren, wobei jeweils benachbarte, sich überlappende Sequenzen, fusioniert wurden. Dafür wurden zunächst mit Hilfe der Standard PCR (2.2.1.1) die Subfragmente amplifiziert, die sich im Fusionsbereich überlappten.

Dieser Überlappungsbereich ermöglichte die komplementäre Basenpaarung der beiden Subfragmente und somit die Fusionierung in einem ersten PCR-Schritt. Dieser Schritt wurde ohne Primer durchgeführt. Die freien OH-Enden, die am 5'-Ende des Fusionsbereiches entstehen, dienten dabei als Primer. Von diesen Bereichen aus konnte die vollständige Amplifikation der zu fusionierenden Fragmente stattfinden. Die einzelnen Fragmente wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt.

In einem finalen PCR-Schritt wurden 10 µl des aufgereinigten Fusionsproduktes mit den äußeren Primern spezifisch amplifiziert. Der Ablauf sowie die Zusammensetzung der finalen PCR entsprach der Standard PCR (2.2.1.1)

2.2.1.3 Screening PCR

Screening PCRs (Überprüfungs-PCRs) wurden nach Transformation in *E. coli* Zellen durchgeführt, um die gewachsenen Klone auf eine korrekte Insertion des gewünschten Genabschnitts in die verwendeten Vektoren zu überprüfen.

Dafür wurden einzelne *E.coli* Kolonien von der LB-Platte gepickt, in den im folgenden dargestellten PCR Ansatz gegeben und mit den Primern amplifiziert, die auch für die Amplifikation des Inserts verwendet wurden:

Komponenten	Eingesetztes Volumen (µl)
Kolonie	-
Puffer (5x)	5
MgCl ₂	2,5
dNTP Mix (10 mM) (dATP; dCTP; dGTP; dTTP)	0,5
forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5
reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5
Taq-Polymerase(5 U/µl)	0,125
	auf 25 µl mit H ₂ O auffüllen

5 min	95°C	Initialdenaturierung	1 Zyklus
1 min	95°C	Denaturierung	} 30 Zyklen
30 sec	60°C	Annealing	
1-8 min, je nach Länge des Amplifikates	72°C	Extension	
5 min, je nach Länge des Amplifikates	72°C	Extension	1 Zyklus

Die Amplifikation der DNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel überprüft (siehe 2.2.2). Bei erfolgreicher Amplifikation wurde die Plasmid-DNA durch eine „Mini-Präparation“ isoliert.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von PCR- und Klonierungsprodukten wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten im analytischen bzw. präparativen Maßstab wurden je nach Fragmentlänge 1-2 %-ige (w/v) Agarosegele (in 1x TAE mit 0,1 µg/ml EtBr) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm in 1x TAE als Laufpuffer.

Für eine Abschätzung der DNA-Konzentration wurde λ-DNA (50 ng/µl, Fermentas) mitgeführt. Vor dem Probenauftrag wurden die DNA-Proben mit 6x Gelladepuffer (Endkonzentration 1x) versetzt.

2.2.3 DNA-Aufreinigung

DNA Aufreinigungen erfolgten mit dem QIAquick®PCR Purification Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das MinElute™Gel Extraction Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.4 Klonierung

2.2.4.1 Topo TA Klonierung

Die NV cDNA Subfragmente *ABC* und *DID2E* wurden entsprechend den Angaben des Herstellers mit Hilfe des Zero Blunt®TOPO®PCR Cloning Kit (Invitrogen) und die NV Volle-Länge-cDNA entsprechend dem Protokoll des TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen) kloniert und anschließend in *E.coli* Top10 Zellen transformiert.

2.2.4.2 Klonierung durch Ligation

2.2.4.2.1 Restriktionsverdau

Zur Spaltung von DNA wurden pro 1 µg DNA 2 U Restriktionsenzym eingesetzt. Restriktionstemperaturen und Restriktionspuffer wurden nach Angaben des Herstellers (Fermentas) gewählt. Der Restriktionsansatz wurde nach Herstellerangaben pipettiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.2.2. Ligation mit Hilfe der T4 DNA-Ligase

Diese Ligationsmethode von *sticky ends* (Überhängende Enden nach Restriktionsverdau) wurde angewendet, um DNA Fragmente, die größer als 5000 bp sind, in den linearisierten Vektor zu klonieren. Die eingesetzte Konzentration des Inserts wurde nach folgender Formel berechnet:

ng Vektor (20 ng) x bp Insertgröße / bp Vektor x molares Verhältnis Insert/Vektor (1/2)

Entsprechend der Berechnung der einzusetzenden Insertmenge wurde der Ligationsansatz wie folgt zusammen pipettiert:

Komponenten	Eingesetztes Volumen (µl)
T4-Ligase (2,5 U)	0,5
Puffer (10x)	2
Vektor	20 ng
Insert	entsprechend der Berechnung der oben genannten Formel
	auf 20 µl mit H ₂ O auffüllen

Der Ligationsansatz wurde ü. N. bei 16 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der T4-Ligase für 10 min bei 65°C.

2.2.4.2.3 Ligation mit Hilfe des Fast Link™ Ligation Kits

Die Klonierung von DNA Fragmenten bis zu einer Größe von 5000 bp erfolgte mit dem Fast Link™ Ligation Kit (siehe 1.5) entsprechend den Angaben des Herstellers. Voraussetzung für diese Ligationsmethode ist ebenfalls die Spaltung des Inserts sowie die Linearisierung des Vektors durch Restriktionsendonukleasen. Die einzusetzende Konzentration des Inserts wird durch die unter 2.2.4.2.2 beschriebene Formel berechnet.

2.2.4.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen:

100 ml LB wurden mit einem Hundertstel Volumen einer *E. coli* ü. N.-Kultur inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,3 kultiviert. Vor dem Ernten der Zellen wurde die Hauptkultur auf Eis für 30 min gekühlt und anschließend bei 2500 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 40 ml TJB1 Puffer (s. 3.1.14) resuspendiert und bei 3500 rpm für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml TJB2 (s. 3.1.14) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*:

4 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl chemisch kompetenter *E.coli* Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 45 s bei 42 °C hitzeinaktiviert und danach für 2 min auf Eis wieder abgekühlt. Nach der

Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die transformierten Zellen für eine Stunde bei 37 °C im Schüttler inkubiert und anschließend auf LB-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Positive Klone wurden durch Anwendung der Screening PCR (s. 2.2.1.3) identifiziert und anschließend sequenziert (s. 2.2.5).

2.2.5 Sequenzierung

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR (10 µl) enthielt jeweils 2 µl Big-Dye-Mix, je 1 µl des entsprechenden Sequenzier-Primers (siehe 1.7) und 0,4 µg der Template-DNA. In nachfolgender Tabelle sind die Bedingungen, unter denen die PCR durchgeführt wurde, aufgeführt.

1 min	96°C	Initialdenaturierung	1 Zyklus
10 sec	96°C	Denaturierung	} 30 Zyklen
5 sec	55°C	Annealing	
4 min	60°C	Extension	

Unter Verwendung des DyeEx 2.0 Spin-Kits der Firma Qiagen (2.1.5) erfolgte die Aufreinigung der DNA-Fragmente. Für die sich anschließende Sequenzierung wurde der Sequencer der Firma Applied Biosystems genutzt.

Die Auswertung der Sequenzierungen wurde mit Hilfe der MAC-Programme *DNA-Strider* und *EDITView* durchgeführt.

2.2.6 *site directed mutagenesis*

Für die Herstellung von Mutantenproteinen wurde das QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (siehe 2.1.5) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Amplifizierung der zu mutierenden Plasmid-DNA entsprach dem Standard PCR Ansatz (siehe 2.2.1.1). Die zur Einführung der gewünschten Mutation verwendeten Primer sind in Tab. 1 (siehe 1.7) aufgelistet.

2.2.7 Methoden für die Arbeiten mit humanen Zellen

2.2.7.1 Kultivierung von 293T-Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden 293T-Zellen erfolgte standardmäßig in Kulturflaschen mit einer Adhärenzfläche von 75 cm² (SARSTEDT). Angeimpft wurden diese Flaschen mit jeweils 5,5 x 10⁵ Zellen. Eine Zellsuspension in 10-12 ml sterilem DMEM Kultivierungsmedium (DULBECCO) wurde mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (DULBECCO) und mit 0,5 % Penicillin/Streptomycin versetzt. Die Kulturen können so 4 Tage bei 37 °C im CO₂-Brutschrank [CO₂-Konzentration: 5 % (v/v)] inkubiert werden. Nach dieser Zeit wurde in der Regel eine Konfluenz von > 90 % erreicht.

2.2.7.2 Ernte einer 293T-Zellkultur

Die Zellernte erfolgte nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen der Zellen mit sterilem Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem PBS (DULBECCO) durch Zugabe von Trypsin-EDTA (DULBECCO) zu den Kulturen. Die Zellen wurden mit dem EDTA-Trypsin für 3-5 Minuten im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche wurden diese in jeweils 10 ml Komplettmedium aufgenommen und in ein steriles 50 ml Falconröhrchen überführt. Von der erhaltenen Zellsuspension wurde anschließend die Zellzahl bestimmt.

2.2.7.3 Bestimmung der Zellzahl

20 µl einer Zellsuspension wurden mit 20 µl Farbstoff (Trypanblau) vermischt und davon 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer appliziert. Unter dem Lichtmikroskop (CARL ZEISS; AXIOVERT 25[®]; Vergrößerung 100x) wurden die Zellen in den vier großen Quadraten gezählt und hiervon der Durchschnittszellwert pro Großquadrat gebildet. Abgestorbene Zellen färbten sich blau und wurden nicht in die Zählung einbezogen. Zur Berechnung der Zellzahl pro Mikroliter wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit 10 (Größenverhältnisse der Neubauer-Zählkammer) und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert.

2.2.7.4 Konservierung einer 293T-Zellkultur

Konfluente Zellen wurden mit EDTA-Trypsin abgelöst und im Anschluss daran wurden die Zellen im Einfriermedium (Komplettmedium [siehe 2.2.7.1] +10 % DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden zu 1 ml in Cryoröhrchen aliquotiert und zunächst im –80 °C Schrank eingefroren. Nach ca. 3-4 Tagen erfolgte die Einlagerung der Zellen im flüssigen Stickstoff.

2.2.7.5 Transiente Transfektion von 293T-Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte durch Polyfect[®] Transfection Reagent (Qiagen). Für die Transfektion von 4×10^6 Zellen wurden 80 µl Liposomenlösung mit 8 µg Plasmid-DNA in 200 µl Serum-freien DMEM gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 600µl Komplettmedium (siehe 2.2.7.1) versetzt, auf die zuvor mit sterilem PBS (siehe 1.2) gewaschenen und in 7 ml Komplettmedium aufgenommenen adhären Zellen gegeben und für 48 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.7.6 Lyse der eukaryontischen Zellen

Die Zellernte erfolgte nach Entfernen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 300µl des 1x Lysis-puffers (s. 2.1.15), worin die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers aus der Kultivierungsschale entfernt und mit Hilfe des QIA-shredderTM-Systems von Qiagen nach Angaben des Herstellers zusätzlich aufgeschlossen.

2.2.8 Proteinchemische Methoden

2.2.8.1 Heterologe Expression in *E.coli*

Für die Expression der rekombinanten NV-Proteine wurde eine 4l Hauptkultur 1:100 mit einer ü. N. Vorkultur, von *E.coli* BL21DE3 Zellen, die mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden, beimpft. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 konnte die Expression mit 1 mM IPTG induziert und die Zellkultur ü. N. bei RT inkubiert werden. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4500 rpm für 15 min und 4°C pelletiert.

2.2.8.2 Zellaufschluss durch Ultraschall

Das nach der Proteinexpression in *E.coli* resultierende Pellet (s. 2.2.8.1) wurde im entsprechenden Puffer + 0,5 % Triton X-100 resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und durch Ultraschall (6x pulse à 30 sec) lysiert. Das Zelllysate wurde durch Ultrazentrifugation bei 40.000 rpm für 90 min gewonnen.

2.2.8.3 Zellaufschluss mit Hilfe von Aluminiumoxid

Pro ein Gramm Zelltrockenmasse des nach der Proteinexpression in *E.coli* resultierenden Pellets wurden 2 g Aluminiumoxid zu dem Pellet gegeben. Die Zellen wurden mit Pistill und Mörser für 15 min bei 4 °C zerrieben. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in Puffer aufgenommen, das Aluminiumoxid sowie die Zelltrümmer für 10 min bei 4500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand, der das Zelllysate enthielt, wurde für 90 min bei 40.000 rpm und 4 °C durch Ultrazentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt.

2.2.8.4 Ammoniumsulfatpräzipitation

Das nach der Proteinexpression geerntete Zelllysate (s. 2.2.8.1) wurde durch 75 %-iges Ammoniumsulfat präzipitiert. Die Präzipitate wurden durch 40-minütige Zentrifugation bei 20.000 rpm geerntet und das Pellet in 5 ml Puffers resuspendiert.

2.2.8.5 Dialyse

Die zu dialysierende Proteinfraction wurde in einen ca. 5 cm langen Dialyseschlauch aus Cellulose (40 mm x 25 mm; SIGMA) pipettiert und ü. N. in 1L Dialysepuffer (siehe 2.1.15.4.3) inkubiert. Abschließend wurde das Proteinlysate nochmals in frischem Dialysepuffer für 2 h dialysiert.

2.2.8.6 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit dem BCATM Protein Assay Kit (PIERCE) nach Angaben des Herstellers. Für die Kalibrierung wurde das im Kit enthaltene BSA verwendet.

2.2.8.7 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Gelelektrophorese fand in Mini-Elektrophoreseeinheiten (9,0 x 7,0 x 0,5 cm) der Firma HOEFER statt. Es wurden in der Regel Trenngele mit einer Konzentration von 12 % bzw. 15 % Acrylamid und 4 %ige Sammelgele verwendet.

Vor dem Auftrag wurden die Proteinproben (Probenvolumen ca. 20 µl) mit 6 x Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1 x, siehe 2.1.15.2) und für 5 min bei 100 °C hitzedenaturiert.

Die Elektrophorese der Proteine erfolgte bei 80 V (Sammelgel) bzw. 100- 120 V im Trenngel (Stromstärke nicht höher als 20 mA) in 1x Laufpuffer. Die Proteine im PAA-Gel wurden, falls erforderlich, mit Coomassie[®] Brillantblau G250 gefärbt.

2.2.8.8 Western Blot (Semi-dry)

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (AMERSHAM BIOSCIENCES) mit einem Semi-dry Blotter (CHRIST). Die Nitrocellulose-Membran wurde kurz in 1 x Transferpuffer equilibriert. Die in entsprechender Größe zugeschnittenen Filterpapiere (GB 002, SCHLEICHER & SCHUELL) wurden ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Vier Lagen des puffergetränkten Filterpapiers wurden luftblasenfrei auf die Anodenplatte gelegt und die Membran darauf platziert. Über das danach aufgelegte Polyacrylamidgel wurden luftblasenfrei vier weitere Lagen Filterpapier postiert. Der Proteintransfer erfolgte für 1 Stunde bei 25 V und 1,5 mA pro cm² Gelfläche (üblicherweise 60 mA).

2.2.8.9 Immunologischer Nachweis

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden diese in Blockierungslösung ü. N. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit dem primären Antikörper (Antikörper-Verdünnung siehe 2.1.6, in 1x PBS/Tween + 5 % (w/v) Magermilchpulver) bei RT inkubiert und danach 4 x 5 min mit 1 x PBS+ 0,5 % Tween 20 gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für 30 min bei RT (Antikörper-Verdünnung siehe 2.1.6, in 1 x PBS/T + 5 % (w/v) Magermilchpulver). Die Membran wurde erneut 3 x für 15 min in 1 x PBS/T gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL^{plus}-Systems™ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) nach Angaben des Herstellers.

2.2.9 Chromatographieverfahren für die Proteinaufreinigung

2.2.9.1 Kationenaustauschchromatographie

Bei der Methode der Kationenaustauschchromatographie konnten nur positiv geladene Proteine an die Säule binden, die anschließend durch negativ geladene Ionen eluiert wurden. Das Proteingemisch, das durch Anwendung der Dialyse (siehe 2.2.8.5) im Bindepuffer (siehe 2.1.15.4.3) NaCl-Ionen frei war, wurde auf eine Kation-Austauschsäule (HiTrap™ SP FF 5 ml Säule; GE HEALTHCARE) injiziert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Elution der gebundenen Proteine über einen ansteigenden NaCl-Gradienten, unter Verwendung eines Elutionspuffers mit einem Endvolumen von 1 M NaCl (siehe 2.1.15.4.3), bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die eluierten Proteine wurden fraktioniert gesammelt.

2.2.9.2 Metallchelatchromatographie- Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Durch die Anwendung der Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurden His-Tag-Fusionsproteine, die eine besonders starke Affinität zu Ni²⁺-Ionen aufwiesen, aufgereinigt. Dafür wurden zunächst die verwendete Säule (HisTrap™ FF crud Säule, GE HEALTHCARE) mit dem Bindepuffer (siehe 2.2.15.4.2) equilibriert. Anschließend erfolgte die Injizierung des Proteinlysats auf die Säule. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden durch einen Imidazolgradienten (Endvolumen des Elutionspuffer weist 500 mM Imidazol auf, siehe 2.2.15.4.2) bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert und fraktioniert gesammelt. Parallel zur Elution der Peptide fand eine Absorptionsmessung bei 280 nm statt.

2.2.9.3 Gelfiltration mit Hilfe der FPLC

Zur Auftrennung eines Proteingemisches entsprechend ihrer Molekulargewichte wurde eine Gelfiltration, unter Anwendung der FPLC, durchgeführt. Die Säule (GPC column HiLoad 16/60 Superdex 75pg; GE HEALTHCARE) wurde zunächst mit dem entsprechenden Puffer equilibriert und anschließend 2 ml des Proteingemisches auf die Säule aufgetragen. Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt und fraktioniert gesammelt, wobei parallel die Absorption bei 280 nm bestimmt wurde.

2.2.10 Proteolytische Aktivitätstests

2.2.10.1 Time course Experiment in *E.coli* zur Analyse der 3CL^{pro} *cis*-Aktivität

Zur Analyse der *cis*-Spaltungsaktivität der NV-3CL^{pro} in Abhängigkeit der Zeit, wurden die Plasmide, die für die zu untersuchenden NV-Vorläuferproteine kodieren, in *E.coli* BL21DE3 Zellen transformiert. Eine 1 ml *E.coli* Hauptkultur wurde 1:100 mit der ü. N. Vorkultur angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 0,7 mit 1mM IPTG versetzt. Vor der Induktion sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion wurde je 1 ml Zellkultur entnommen. Die Zellpellets wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 12000 rpm gewonnen und anschließend in 500 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.2.10.2 Spaltungsanalyse mit Hilfe der *in vitro* Transkription/Translation

Die Expression des NV-ORF1 Polyproteins wurde mit Hilfe des PROTEINSCRIPT™ T7 Kits (AMBION, siehe 1.5) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich zum Standardansatz, der den Angaben des Herstellers entsprach, wurden die Reaktionsansätze mit 4 µM der aufgereinigten 3CL^{pro} koinkubiert. Allen Ansätzen wurde 0,5 µM [³⁵S]-Methionin (HARTMANN ANALYTIC, 10 µCi/µL) zugesetzt. Die Analyse der radioaktiv markierten Translationsprodukte erfolgte durch Autoradiographie mit Hilfe des Phosphorimagers (FUJIFILM).

2.2.10.3 *In vitro trans*-Spaltungsassay

Für *trans* Aktivitätsstudien der NV-3CL^{pro} wurden fünf verschiedene Peptide (siehe 2.1.10), die die putativen Spaltstellen des NV-ORF1 Polyproteins aufwiesen, als Substrat eingesetzt. Zunächst wurden die lyophilisierten Peptide in 3CL^{pro}-Puffer (siehe 2.1.15.4.1) so gelöst, dass eine Endkonzentration von 1mg/ml vorlag.

Für den Assay wurden 4 μM des Enzyms mit 30 μM des zu untersuchenden Peptides gemischt und der Ansatz mit 3CL^{pro}-Puffer auf ein Endvolumen von 50 μl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für 17 h bei 30 °C. Durch Zugabe von 0,5 % TFA wurde die Reaktion anschließend gestoppt. Die Analyse erfolgte unter Anwendung der *reversed-phase* Chromatographie (2.2.10.8.1) mit Hilfe der HPLC.

2.2.10.4 Kompetitionsassay zur Untersuchung der relativen Spaltspezifitäten

Für den Kompetitionsassay wurden gleichzeitig 30 μM des Kompetitionspeptids 2C^{NTPase}/p20 (PK) mit je 30 μM eines zweiten Peptids (P), und 1 μM der 3CL^{pro} bzw. des Fusionsproteins 3CL^{pro} _{μE1189A} 3DL^{pol} inkubiert. Die Durchführung und Auswertung der Reaktion entsprach dem in *vitro trans*-Spaltungsassay (siehe 2.2.10.3). Die Berechnung der relativen Spaltspezifitäten erfolgte wie unter 2.2.10.5 beschrieben.

2.2.10.5 Berechnung der relativen Spalteffizienzen

Die Berechnung der relativen Spalteffizienzen erfolgte unter Verwendung folgender Formel: $(v_{\text{max}}/k_m)_X / (v_{\text{max}}/k_m)_Y = \log(1-F_X) / \log(1-F_Y)$. Dabei handelt es sich bei V_{max} um die maximale Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion, K_m stellt die Michaelis Menden Konstante dar. Die Konstante (F) steht für die Spalteffizienz (O'Leary and Baughn 1972, Pallai 1989). Für die Berechnung von (F) wurden die integrierten maximalen Absorptionswerte_{215nm} (mAU) der durch die *reversed-phase* Chromatographie (siehe 2.2.10.8.1) eluierten Peptide verwendet. Die Spalteffizienz (F) ergab sich aus dem Quotienten von mAUProdukt/mAUSubstrat.

2.2.10.6 Statistische Berechnungen

Vergleichende statistische Analysen der relativen Spalteffizienzen wurden unter Verwendung eines nicht-parametrischen Mann-Whitney *U* Tests mit Hilfe der GraphPad Software InStat version 3.0a für Macintosh (San Diego, California, USA) durchgeführt. Der Signifikanzgrad wurde durch * ($p < 0,015$) und ** ($p < 0,001$) dargestellt.

2.2.10.7 Inhibierungstest der 3CL^{pro}

Die Inhibierungstests der NV-3CL^{pro} wurden unter Verwendung des in *vitro-trans*-Spaltungstests durchgeführt (siehe 2.2.10.3). Die zu testenden Inhibitoren wurden mit DMSO so gelöst, dass sie in einer Stockkonzentration von 1mg/ml vorlagen. Für die Inhibierungstests wurden jeweils 20 µM, 40 µM, 80 µM, 160 µM, 320 µM; 640 µM und 800 µM der zu testenden Substanz mit 60 µM des Peptids p37/2C^{NTPase} mit 4 µM der 3CL^{pro} inkubiert. Für den Kontrollansatz wurde das Peptid nur mit der 3CL^{pro} inkubiert. Die Spaltungen wurden durch die *reversed-phase*-Chromatographie (siehe 2.2.10.8.1) analysiert und anschließend die Spalteffizienzen (F) berechnet. Die Bestimmung der relativen Spalteffizienz (V_{max}/K_m) erfolgte wie unter 2.2.10.5 beschrieben.

2.2.10.8 Analysemethoden

2.2.10.8.1 *Reversed-phase Chromatographie* (HPLC)

Die Analyse der *trans*-Spaltungsassays (siehe 2.2.10.3) erfolgte unter Anwendung der *reversed-phase Chromatographie* mit Hilfe der HPLC. Dafür wurden 20 µl des zu analysierenden Ansatzes auf die HPLC-Säule [YMCPack ODS-AQ column (YMC Europe), 4.6 mm x 12 cm] injiziert. Die Elution erfolgte durch einen 15 %-65 %igen Gradienten einer 65 %igen Acetonitril/H₂O Lösung bei einer Flussrate von 1ml/min. Die Absorptionmessung der eluierten Peptide erfolgte bei 215 nm. Für die Auswertung wurden die Absorptionswerte integriert und als maximale Absorptionseinheit (mAU) in einem Diagramm gegen die Retentionszeit (t min) aufgetragen (Software:Unicorn 2.10).

2.2.10.8.2 Massenspektrometrie

Eine massenspektrometrische Analyse der Spaltprodukte wurde an der MassSpectrometry Facility, MPI-CBG, Dresden durchgeführt. Die MALDI-Analyse erfolgte mit Hilfe eines Reflex IV MALDI time-of-flight Massspectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) im Reflexivmodus unter Verwendung von α-cyano-4-hydroxy-*trans*-Cinnaminsäure als Matrix (Thomas *et al.*, 2004). Anhand der Massen von Trypsin-Autolyseprodukten konnten die Spektren extern kalibriert werden. NanoESI-MS und MS/MS Analysen wurden an einem Hybrid quadrupole time-of-flight Massenspektrometer (QSTAR Pulsar I, MDS Sciex, Concord, Canada) durchgeführt. Dieser ist mit einer automatischen, Chip basierten Nanoflow Ionenquelle (Advion, Ithaca, NJ, USA) ausgestattet.

Die Auswertung der Spektren erfolgte unter Anwendung der Software BioAnalyst QS v.1
(MDS Sciex, Concord, Canada)

3. Ergebnisse

Das humanpathogene, Gastroenteritiden verursachende Norovirus kann bislang in einem Zellkultursystem nicht angezüchtet werden. Aus diesem Grund konnten grundlegende Untersuchungen zum Verständnis des Replikationszykluses bisher nicht durchgeführt werden. Das Vorliegen des kompletten cDNA-Virusgenoms würde die Voraussetzung für funktionale Studien der Norovirusreplikation bieten, wie z.B. Charakterisierungsstudien zum initialen Schritt der NV-Replikation, der Prozessierung des *ORF1* kodierten Polyproteins. Um diesen Schritt untersuchen zu können bestand die erste Aufgabe dieser Arbeit darin, das komplette Norovirus cDNA-Genom zu generieren und anschließend zu klonieren. Der NV-Volle-Länge Klon diente als Grundlage für die Generierung von 3CL^{pro} Vorläuferproteinen, anhand deren die *cis*-Spaltung des Polyproteins untersucht werden sollte. Die zweite Aufgabe bestand in der Aufreinigung der aus Vorläuferproteinen freigesetzten 3CL^{pro} und 3CL^{pro}3DL^{pol} Fragmente, um die Prozessierung des NV-Polyproteins *in trans* charakterisieren zu können. Die dritte Aufgabe dieser Studie umfasste die Verifizierung der kotranslationalen Spaltung des Polyproteins sowohl im zellfreien System als auch im Zellkultursystem.

3.1 Generierung eines Norovirus Genotyp II Volle-Länge cDNA Klons

3.1.1 Amplifikation der NV-Einzelfragmente A, B, C, D1, D2, E

Die Generierung des NVII cDNA-Genoms basierte auf sechs sich überlappenden cDNA-Fragmenten (A, B, C, D1, D2, E), die zu Beginn dieser Arbeit bereits vorlagen (Herzog, 2004). Zur Herstellung der cDNA-Fragmente wurden in einer vorhergehenden Arbeit zunächst RNA-Fragmente aus Stuhlproben, von mit Norovirus Genogruppe II/4 infizierten Patienten, isoliert (Rohayem *et al.*, 2004). Diese RNA-Fragmente dienten als Template für die Amplifikation von cDNA-Fragmenten mit Hilfe der simplex RT-PCR unter Verwendung von degenerierten Primern (siehe Tab. 2.1.7). Die Herstellung der degenerierten Primer basierte auf der Genomsequenz des Norovirusstammes der Genogruppe II/3 Lorsdale/1993/UK, der mit der *GeneBank accession* Nummer: X86557 veröffentlicht wurde. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sich die amplifizierten Fragmente gegenseitig überlappten (Rohayem *et al.*, 2004). Die so generierten cDNA-Fragmente wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und anschließend sequenziert. Bioinformatische Analysen identifizierten die isolierten cDNA Fragmente als Teilbereiche des NV-GGII/4-Genoms. Die sechs oben angegebenen cDNA-Fragmente umfassten das komplette NV-GGII/4-cDNA Genom, wobei die Fragmente A, B und C den NV-GGII/4-*ORF1* präsentierten, die Fragmente

D1 und D2 dem NV-GGII/4-*ORF2* entsprachen und das Fragment E den NV-GGII/4-*ORF3* darstellte. Für die Herstellung des NV-Volle-Länge cDNA-Klons sollten zunächst die Fragmente A, B und C fusioniert werden, um das Fragment ABC herzustellen. Die Fragmente D1, D2 und E sollten zum Fragment D1D2E generiert werden. Abschließend sollten die Fragmente ABC und D1D2E so fusioniert werden, dass das NV-Volle-Länge cDNA-Genom generiert werden kann (siehe Skizze in Abb.13).

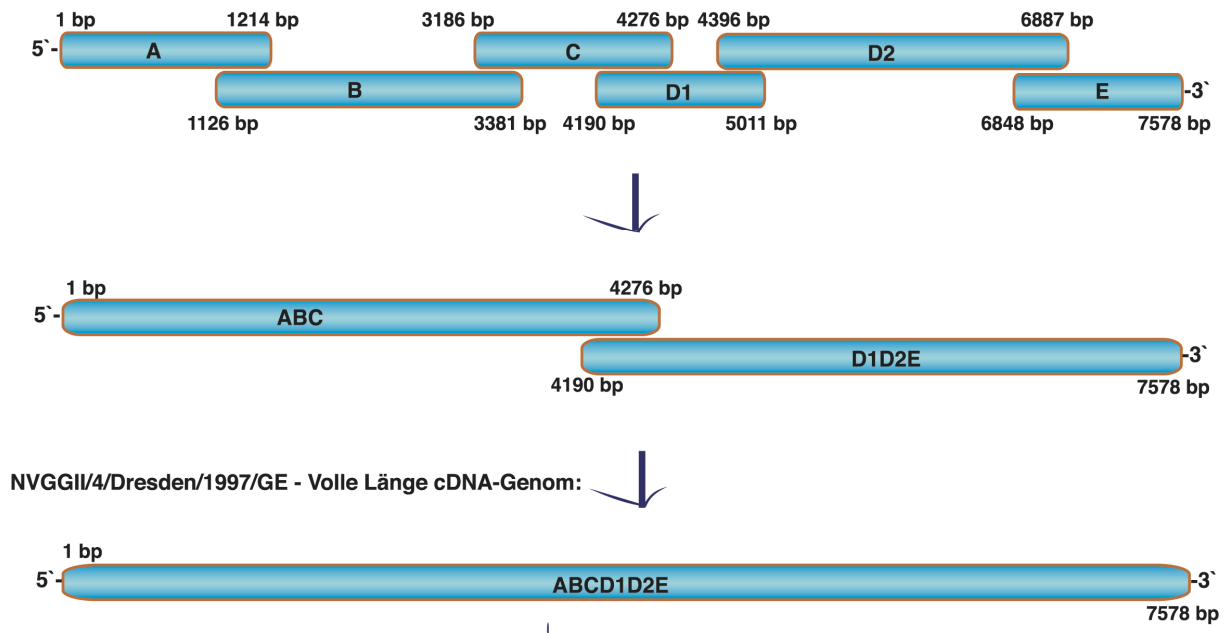


Abbildung 13: Skizze zur Herstellung des NV-Volle Länge cDNA-Genoms

Die sich überlappenden Fragmente A, B, C, D1, D2 und E umfassen das komplette cDNA-Genom des Stammes NV-GGII/Dresden/1997/GE. Die Fragmente A, B, und C werden so fusioniert, dass das Subfragment ABC hergestellt wird. Das Subfragment D1D2E wird durch die Fusionierung der Fragmente D1, D2 und E generiert. Das Volle-Länge cDNA-Genom soll über die Fusion der sich überlappenden Fragmente ABC und D1D2E hergestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die cDNA-Einzelfragmente mit den im Kapitel 2.1.7 angegebenen Primern amplifiziert. Es konnten das Fragment A mit einer Länge von 1214 bp (Abb. 14, Spur 2), das 2255 bp lange Fragment B (Abb. 14, Spur 3), das 1090 bp lange Fragment C (Abb. 14, Spur 4), das 821 bp Fragment D1 (Abb. 14, Spur 5), das Fragment D2 mit einer Länge von 2491 bp (Abb. 14, Spur 6) sowie das 730 bp lange Fragment E (Abb. 14, Spur 7) nachgewiesen werden.

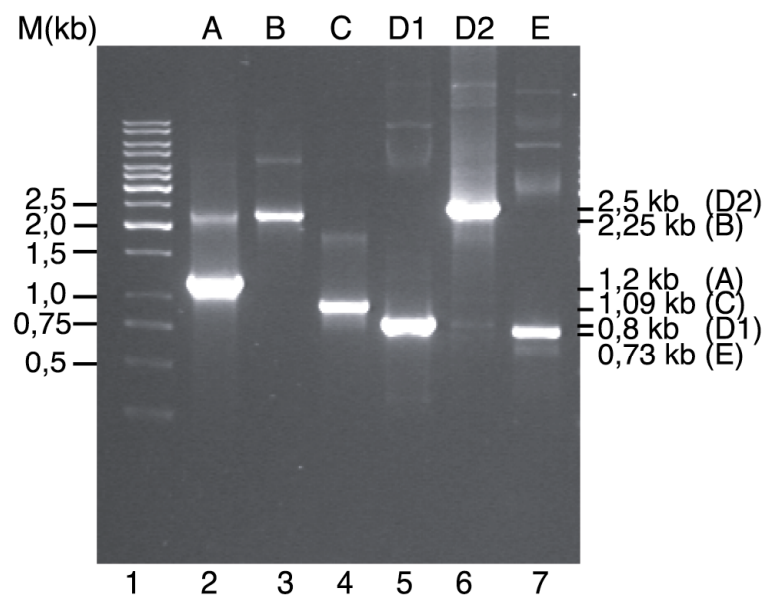


Abbildung 14: Amplifikation der NV-cDNA-Einzelfragmente

Amplifikation der NVII-cDNA Einzelfragmente A (Spur 2; 1,2 kb), B (Spur 3; 2,25 kb), C (Spur 4; 1,09 kb), D1 (Spur 5; 0,8 kb), D2 (Spur 6; 2,5 kb), E (Spur 7; 0,73 kb) mit Hilfe der Standard-PCR und den im Kapitel 2.1.7 aufgelisteten Primern. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 % igen Agarosegel aufgetrennt. Auf Spur 1 wurde der DNA-Marker (M) mitgeführt.

3.1.2 Konstruktion der NV-Fusionsfragmente ABC und D1D2E

Das Einzelfragment A wies in seinem 3'-terminalem Ende einen Homologiebereich von 88 bp zum 5'-terminalen Ende des Fragmentes B auf. Der Überlappungsbereich zwischen Fragment B und C betrug 195 bp. Diese komplementären Bereiche ermöglichten die gleichzeitige Fusion der Fragmente A, B und C in einem Schritt mit Hilfe der *overlap-Extension* PCR (siehe Kapitel 2.2.1.2). In einem zweiten PCR-Schritt wurde das Fusionsfragment ABC unter Verwendung der Primer #13 und #14 (2.1.7) amplifiziert. Die Analyse dieses PCR-Schrittes wies ein Produkt in der erwarteten Höhe des ABC Fragmentes von ca. 4300 bp auf (Abb. 15, Spur 2). Das ABC cDNA-Fragment wurde in den Vektor pCR®4Blunt-TOPO® kloniert und anschließend sequenziert.

Analog zur Generierung des ABC Fragmentes wurde das Fusionsfragment D1D2E hergestellt. Das Fragment D1 wies in seinem 3'-terminalen Ende einen komplementären Bereich von 615 bp zum 5'-terminalen Ende des Fragmentes D2 auf.

Der Überlappungsbereich zwischen den Fragmenten D2 und E betrug 39 bp. Dies ermöglichte die Fusion der Einzelfragmente mit Hilfe der *Overlap-Extension* PCR.

In dem sich anschließenden finalen PCR Schritt, unter Verwendung der Primer #15 und #12 (siehe Kapitel 2.1.7), wurde das Fusionsprodukt D1D2E spezifisch amplifiziert.

Nach Auftrennung des Amplifikates im Agarosegel konnte ein PCR-Produkt, das die erwartete Größe des ca. 3400 bp großen D1D2E Fragmentes aufwies, dokumentiert werden (Abb. 15, Spur 3). Dieser cDNA-Abschnitt wurde in den Vektor pCRBluntII TOPO kloniert und dadurch das Plasmid pUSNORII-D1D2EBluntII TOPO erzeugt. Die sich anschließende Sequenzierung bestätigte die korrekte Fusion.

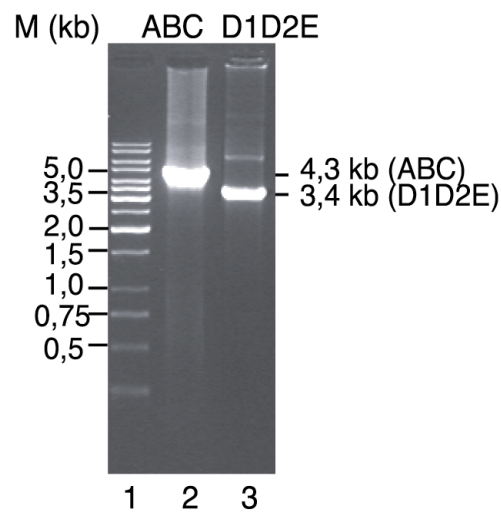


Abbildung 15: Generierung der beiden Subfragmente ABC und D1D2E

Konstruktion der beiden Subfragmente ABC (Spur 2; 4,3 kb) und D1D2E (Spur 3; 3,4 kb) mit Hilfe der overlap-Extension PCR in zwei Schritten. Der erste Schritt erfolgte jeweils ohne die Verwendung von Primern. Im einem zweiten Schritt erfolgte jeweils die spezifische Amplifikation der Fusionsfragmente, die anschließend in einem 1% igen Agarosegel aufgetrennt wurden. Auf Spur 1 wurde der DNA-Marker (M) mitgeführt.

3.1.3 Generierung des NVII-Volle Länge cDNA Klons durch Fusion von ABC und D1D2E

Die Generierung der beiden Subfragmente ABC und D1D2E (siehe Kapitel 3.1.2) war die Voraussetzung für die Herstellung eines NV-Volle-Länge cDNA-Fusionsfragmentes. Im Verlauf der Amplifizierung des ABC-Fragmentes wurde durch den Primer #14 ein 3'-Überhang an das Amplifikat angefügt (siehe Kapitel 3.1.2). Dieser Überhang ermöglichte die Überlappung des Fragmentes ABC zum komplementären Bereich des 5'-Ende des Fragmentes D1. Analog dazu wurde durch die Verwendung des Primers #15 an das 5'-Ende des zu amplifizierenden Fusionsproduktes D1D2E der komplementäre Bereich des 3'-Endes des Fragmentes C als Überhang angefügt (siehe Kapitel 3.1.2). Das Anhängen dieser zusätzlichen komplementären Bereiche diente der Vergrößerung des Homologiebereichs zwischen Fragment ABC und D1, wodurch eine effizientere Fusion der beiden Subfragmente ABC und D1D2E ermöglicht werden sollte. In einem ersten PCR Schritt wurden diese beiden Subfragmente mit Hilfe der *Overlap-Extension* PCR fusioniert. In einem zweiten PCR-Schritt wurde das Fusionsprodukt spezifisch, unter Verwendung der Primer #12 und #13 amplifiziert. Das resultierende, ca. 7500 bp lange, PCR-Produkt (Abb. 16A, Spur 2) verdeutlichte die Fusionierung der beiden Subfragmente und somit die erfolgreiche Generierung des kompletten, 7578 bp umfassenden, NV-GGII/4/Dresden/1997/GE-cDNA Genoms. Das NV-cDNA Genom wurde in den Vektor pIRESneo3 kloniert. Mit Hilfe eines Restriktionsverdaus mit den Enzymen *Eco47III* und *NotI* konnte die Insertion des Volle-Länge NV-cDNA Genoms bestätigt werden (Abb. 16B, Spur 2). Anschließend erfolgte die vollständige Sequenzierung des Plasmid pUSNORII-VLIRES. Nach Auswertung der Sequenzierung wurde das korrekte NV-Volle-Länge Genom mit der *Genebank Accession Number*: AY741811 veröffentlicht.

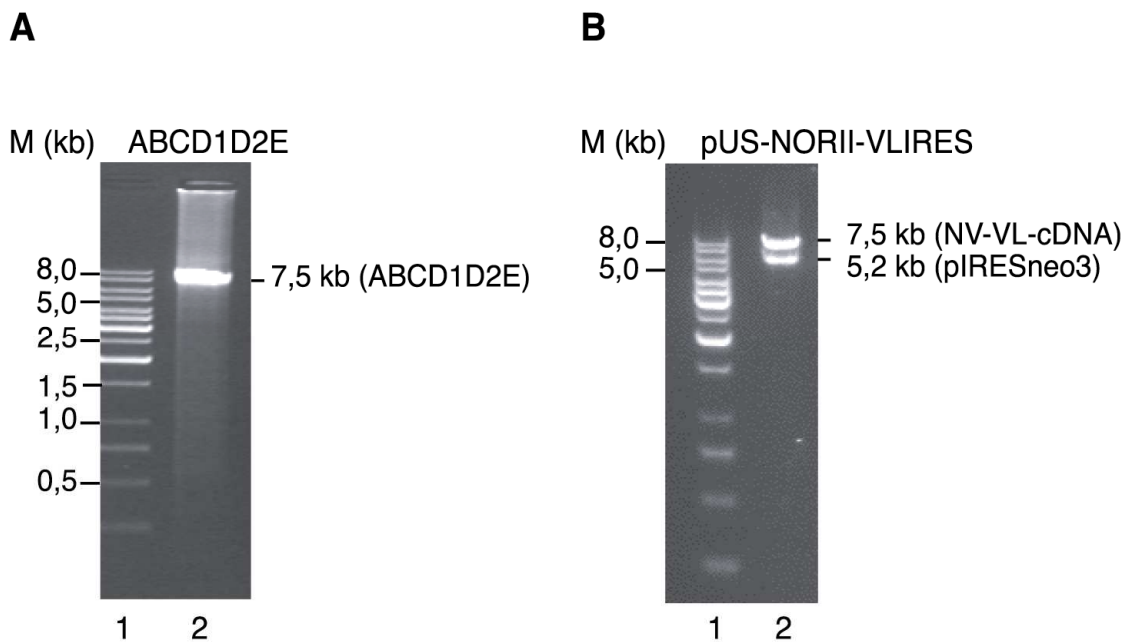


Abbildung 16: Generierung des NV-GGII/4/Dresden/1997/GE -Volle Länge cDNA-Klons

A: Die Fusion der Subfragmente ABC und D1D2E erfolgte mit Hilfe der overlap-extension PCR (siehe Kapitel 2.2.1.2). Das 7,5 kb große PCR-Produkt wurde in einem 0,8 % igen Agarosegel aufgetrennt. **(B).** Das 7,5 kb große cDNA Genom wurde in den 5,2 kb großen Vektor pIRESneo3 kloniert und die Insertion durch Restriktionsverdau mit den Enzymen Eco47III und NotI überprüft. Auf den Spuren 1 wurde der DNA-Marker (M) mitgeführt.

3.2 Charakterisierung der Prozessierung des ORF1-Polypeptids

Bei den Vertretern der Virusfamilie der *Picornaviridae* ist die Voraussetzung für die Virusvermehrung die kotranslationale, autokatalytische Spaltung des vom *ORF1* kodierten Polypeptids (Hanecak *et al.*, 1984). Für das feline Calicivirus konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Spaltung des *ORF1*-Polypeptids auf die kotranslationale Aktivität der viruseigenen 3CL^{pro} zurückzuführen ist (Sosnovtseva *et al.*, 1999). Die Spaltung des Polypeptids resultiert in der Freisetzung der nicht-strukturellen Proteine, die daraufhin den Replikationskomplex ausbilden. Somit basiert auf einer korrekten sequentiellen Prozessierung des *ORF1* Polypeptids der initiale Schritt der Virusreplikation.

3.2.1 Cis-Spaltung des NVII-ORF1 Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} Vorläufer Proteins

3.2.1.1 Kotranslationale Spaltung des Vorläuferproteins Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} und Freisetzung des 3CL^{pro} Fragmentes

In Anlehnung der Ergebnisse zur autokatalytischen Spaltung des FCV-Polyproteins (Sosnovtseva *et al.*, 1999) sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob die Prozessierung eines ORF1 Vorläuferproteins auf der kotranslationalen Spaltaktivität der 3CL^{pro} basiert. Das für diese Untersuchung verwendete Vorläuferprotein enthielt die komplette Sequenz der 3CL^{pro}, die N-terminal von der Spaltstelle des VPg Proteins und C-Terminal von den ersten 61 Aminosäuren der 3DL^{pol} flankiert wurde. Somit befanden sich, sowohl am N-terminalen Ende als auch am C-terminalen Ende der 3CL^{pro}, die putativen Spaltstellen (siehe 1.7), an denen die kotranslationale Spaltung des Vorläuferproteins stattfindet (Abb. 17).

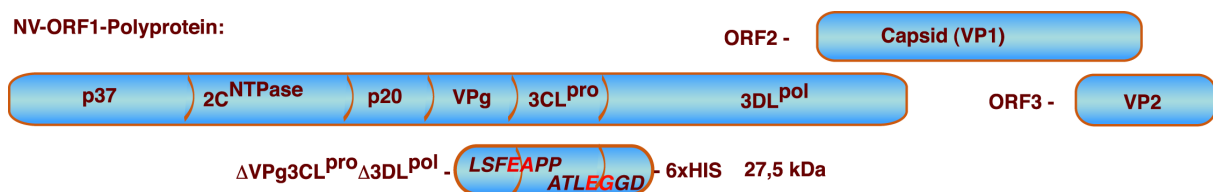


Abbildung 17: Schematische Darstellung des ORF1 Vorläuferproteins Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol}

Das NVII-ORF1 Vorläuferprotein Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} wurde in dieser Darstellung in Bezug zum kompletten noroviralen ORF1 Polyprotein dargestellt. Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} umfasste die komplette Sequenz der 3CL^{pro}. N-terminal wurde sie von der Spaltstelle des VPg Proteins und C-terminal von den N-terminalen 61 AS der 3DL^{pol} flankiert.

Für diese Aktivitätsstudien wurde die für das NV-Vorläuferprotein Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} kodierende Sequenz in den prokaryotischen Expressionsvektor pET28b inseriert. Das resultierende Plasmid pUSNORII- Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol}ET28b wurde in den *E.coli* Expressionsstamm BL21DE3 transformiert. Für die Prozessierungsstudie des Vorläuferproteins wurde vor der Induktion der Proteinexpression das *E.coli* Zelllysate geerntet. Darüber hinaus wurden 0,03 h (2 min), 0,5 h und 24 h nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG die Zelllysate gewonnen. Diese Zelllysate wurden im SDS-Gel aufgetrennt und durch einen Immunoblot unter Verwendung eines polyklonalen anti-3CL^{pro} Serums analysiert.

Schon 0,03 h (2 min) nach der Induktion (Abb. 18, Spur 2) konnte die Expression des 27,5 kDa großen Vorläuferproteinproteins nachgewiesen werden. Nach 0,5-stündiger Expressionszeit (Abb. 18, Spur 3) war eine deutlich stärkere Expression des 27,5 kDa Vorläuferproteins nachweisbar. Zusätzlich zu dem Vorläufer konnten zwei niedermolekulare Proteine bei ca. 19 kDa detektiert werden. Bei dem höhermolekularen Protein handelte es sich möglicherweise um das freigesetzte Vorläuferprotein $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}$, bei dem eine Spaltung zwischen 3CL^{pro} und 3DL^{pol} , an dem Glutaminsäure/Glycin (E/G) Motiv, stattgefunden hatte. Bei dem Protein, das eine höhere Mobilität im Gel zeigte, handelte es sich um die aus dem Vorläuferproteinprotein freigesetzte 3CL^{pro} . Die Prozessierung des Vorläuferproteins fand vermutlich an dem N-terminalen Spaltmotiv Glutaminsäure/Alanin zwischen VPg und 3CL^{pro} sowie an dem C-terminalen Spaltmotiv Glutaminsäure/Glycin (E/G) zwischen 3CL^{pro} und 3DL^{pol} statt. Nach 24-stündiger Expression konnte nur noch das 19 kDa große 3CL^{pro} Fragment nachgewiesen werden (Abb. 18, Spur 4). Das putative C-terminale Spaltprodukt konnte aufgrund seines geringen Molekulargewichts von ca. 6 kDa im Laemmli-SDS Gel nicht nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob die Spaltung des Vorläuferproteins auf die Aktivität der 3CL^{pro} zurückzuführen war, wurde eine Mutante des Vorläuferproteins, $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}_{\mu\text{C139A}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$, hergestellt. Bei dieser Mutante wurde mit Hilfe der *site-directed Mutagenesis* (siehe 2.2.6) im aktiven Zentrum GDCG der 3CL^{pro} (siehe 1.7) der hoch konservierte Cysteinrest C139 gegen einen Alaninrest ausgetauscht. Die Einführung dieser Mutation hatte eine Inaktivierung der 3CL^{pro} zur Folge. Nach 24-stündiger Expressionszeit des mutierten Vorläuferproteins $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}_{\mu\text{C139A}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ konnte einzig die spezifische Bande des 27,5 kDa großen Vorläuferproteins nachgewiesen werden (Abb. 18, Spur 5). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Spaltung des Vorläuferproteins auf einer *cis*-Aktivität des 3CL^{pro} Fragmentes zurückzuführen ist. Darüber hinaus verweist dieses Ergebnis darauf, dass die Freisetzung der 3CL^{pro} aus dem kompletten Polyprotein auf der *cis*-Aktivität der viruseigenen Protease 3CL^{pro} basiert.

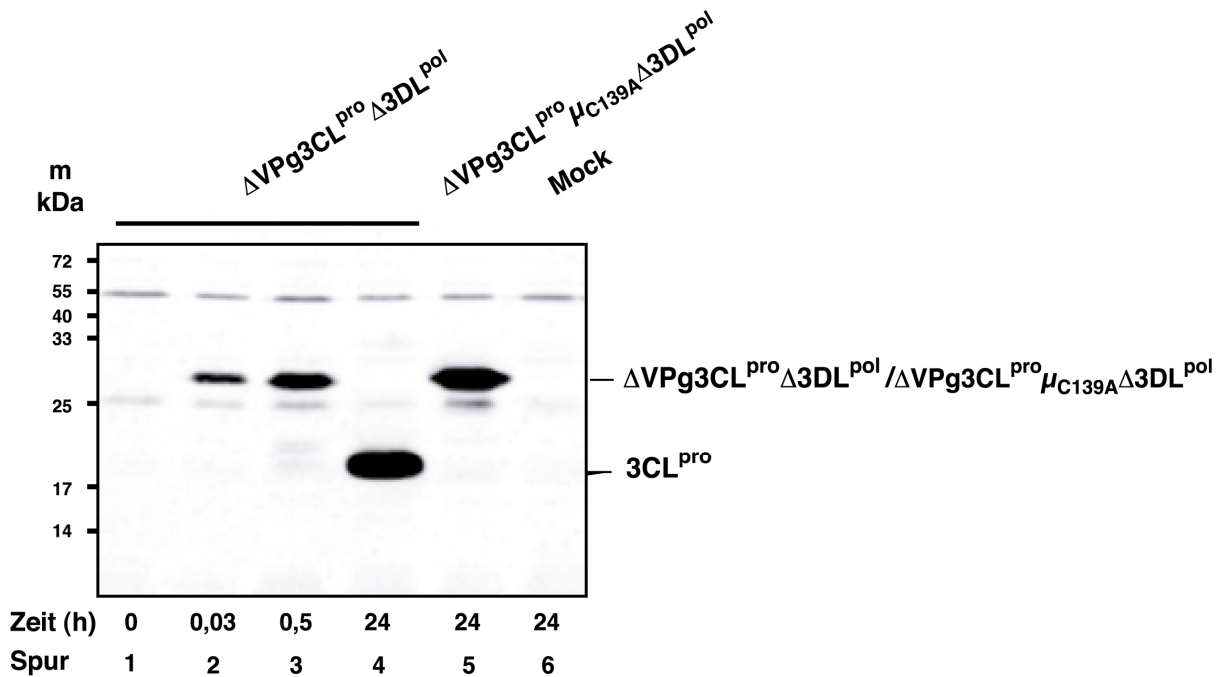


Abbildung 18: Cis-Aktivitätstest des NVII-ORF1 Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$

E.coli Zelllysate, die vor der Induktion der heterologen Expression des Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$ mit IPTG geerntet wurden (Spur 1) sowie Zelllysate, die 0,03 h (Spur 2), 0,5 h (Spur 3) und 24 h (Spur 4) nach der Induktion mit IPTG geerntet wurden (siehe 2.2.8.1), wurden in der SDS-Page aufgetrennt und immunologisch durch Western Blot Analyse mit einem polyklonalen rabbit-anti- $3CL^{pro}$ Antikörperserum analysiert. Zur Überprüfung, ob die Prozessierung des Vorläuferproteins auf der Aktivität der $3CL^{pro}$ beruht, wurde das mutierte Vorläuferproteinprotein $\Delta VPg3CL^{pro} \mu_{C139A} \Delta 3DL^{pol}$, das eine Mutation im aktiven Zentrum der $3CL^{pro}$ aufwies, ebenfalls 24 h exprimiert und das Zelllysate analysiert (Spur 5).

In dem vorangegangenen Experiment (siehe 3.2.1.1) konnte nachgewiesen werden, dass nach ca. 0,5-stündiger Expression in *E.coli* die Prozessierung des $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$ Vorläuferproteins beginnt. Nach 24-stündiger Expressionszeit lag das Vorläuferprotein vollständig gespalten vor, so dass nur noch das $3CL^{pro}$ Fragment nachweisbar war. Für eine genauere zeitliche Charakterisierung der Prozessierungsreaktion wurden, zusätzlich zu den Zelllysaten, die 0,03 h (2 min) und 0,5 h nach Expressionsinduktion geerntet wurden, auch Zelllysate untersucht, die nach einer-, zwei-, vier-, acht- und zehn Stunden Expression gewonnen wurden. Diese Zelllysate wurden im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 19). Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse, unter Verwendung des polyklonalen anti- $3CL^{pro}$ Serums, konnte nach 0,5-stündiger Expressionszeit sowohl das 27,5 kDa große Vorläuferprotein als auch sein 19 kDa großes Spaltprodukt nachgewiesen werden (Abb. 19, Spur 3).

Hiermit konnte bestätigt werden, dass die Prozessierung des $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ Vorläuferproteins nach ca. 0,5-stündiger Expressionszeit beginnt. Bereits eine Stunde nach Expressionsbeginn konnte nur noch das 19 kDa $3CL^{pro}$ Spaltprodukt nachgewiesen werden (Abb. 19, Spur 4). Auch im weiteren Verlauf der Expression konnte zu keinem späteren Zeitpunkt als 0,5 h nach Expressionsbeginn das Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ nachgewiesen werden. Nur die freigesetzte 19 kDa $3CL^{pro}$ wurde im Zelllysats angereichert und konnte nachgewiesen werden. Nach ca. achtstündiger Expressionszeit konnte im Immunoblot ein ca. 23 kDa großes Protein (Abb. 19, Spur 7) nachgewiesen werden, dass im weiteren Verlauf der Expressionszeit angereichert wurde. Bei diesem Protein konnte es sich weder um das putative 19,4 kDa große Spaltprodukt $\Delta VPg3CL^{pro}$ noch um das putative 27 kDa große Spaltprodukt $3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ handeln. Möglicherweise handelte es sich bei diesem Protein um ein Spaltprodukt des Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$, das durch eine unspezifische Spaltung durch *E.coli* Proteasen hervorgerufen wurde. Vorstellbar wäre auch, dass durch eine Kreuzreaktion des anti- $3CL^{pro}$ Serums ein ca. 23 kDa großes *E.coli* Protein detektiert wurde. Des Weiteren wurde nach ca. 10-stündiger (Abb.19, Spur 8) und nach 24-stündiger Expressionszeit (Abb. 19, Spur 9) ein ca. 30 kDa großes Protein detektiert, welches wahrscheinlich ebenfalls durch eine unspezifische Bindung des anti- $3CL^{pro}$ Serums, nachgewiesen wurde.

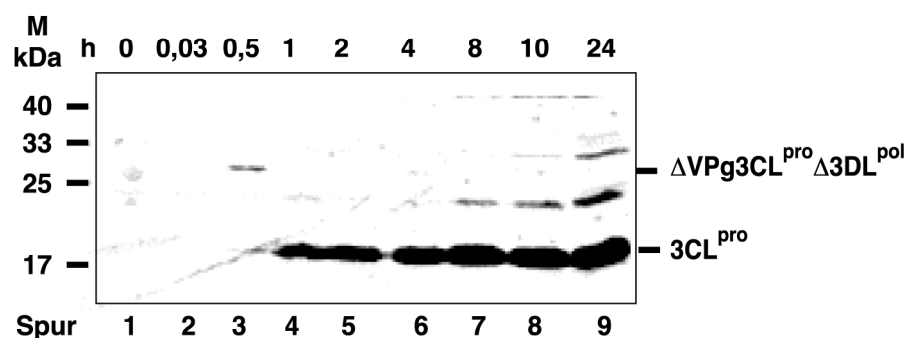


Abbildung 19: Prozessierungsstudie des NVII-ORF1 Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ im zeitlichen Verlauf

Auftrennung der *E.coli* Zelllysate in der SDS-Page, die vor der Induktion der heterologen Expression des Vorläuferproteins $\Delta VPg\Delta 3CL^{pro}_{C139A}\Delta 3DL^{pol}$ mit IPTG geerntet wurden (Spur 1), nach 0,03 h (Spur 2), nach 0,5 h (Spur 3), nach 1 h (Spur 4), nach 2 h (Spur 5), nach 4 h (Spur 6), nach 8 h (Spur 7) nach 10 h (Spur 8) und nach 24 h (Spur 9) Expressionszeit. Die Charakterisierung der zeitabhängigen Prozessierung des Vorläuferproteins $\Delta VPg\Delta 3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ erfolgte mit Hilfe des Immunoblots unter Verwendung des polyklonalen rabbit-anti- $3C^{pro}$ Antikörperserums.

3.2.1.2 *Cis*-Spaltung des Vorläuferproteins $\Delta\text{VPg3CL}^{\text{pro}}\Delta\text{3DL}^{\text{pol}}$ im eukaryotischen Zellsystem

Die kotranslationale *in cis*-Spaltung des $\Delta\text{VPg3CL}^{\text{pro}}\Delta\text{3DL}^{\text{pol}}$ Vorläuferproteins, in Abhängigkeit der 3CL^{pro} -Aktivität, sollte in einem eukaryotischen Zellsystem verifiziert werden. Dafür wurde das Plasmid $\text{pUSNORII-}\Delta\text{VPg3CL}^{\text{pro}}\Delta\text{3DL}^{\text{pol}}\text{IRES}$ generiert. Es kodierte für die 57 C-terminalen Aminosäuren des VPg Proteins, denen sich in 5'-Richtung die vollständige Sequenz der 3CL^{pro} sowie die N-terminalen 61 Aminosäuren der 3DL^{pol} anschloss. Eine 293T-Zellkultur (siehe 2.1.13) wurde mit $\text{pUSNORII-}\Delta\text{VPg3CL}^{\text{pro}}\Delta\text{3DL}^{\text{pol}}\text{IRES}$ mit Hilfe von Polyfect (siehe 2.2.7.5) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h *post transfection* lysiert und ihr Zelllysats im SDS-Gel aufgetrennt. Unter Verwendung des polyklonalen anti- 3CL^{pro} Serums konnten im Immunoblot zwei Expressionsprodukte nachgewiesen werden (Abb. 20, Spur 1). Das Produkt mit höherem Molekulargewicht entsprach mit ca. 37 kDa dem unprozessierten 37 kDa großen $\Delta\text{VPg3CL}^{\text{pro}}\Delta\text{3DL}^{\text{pol}}$ Vorläuferprotein. Das prozessierte 3CL^{pro} Fragment konnte in einer Höhe von ca. 19 kDa nachgewiesen werden. Aufgrund der Ergebnisse des unter Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen *in vitro*-Versuches wurde vermutet, dass die Spaltung des Vorläuferproteins auf der 3CL^{pro} Aktivität beruht. Für eine Bestätigung dieser Annahme wurde das mutierte Vorläuferproteins $\Delta\text{VPg3CL}^{\text{pro}}\mu_{\text{C139A}}\Delta\text{3DL}^{\text{pol}}$, das ein inaktives katalytisches Zentrum aufwies, ebenfalls in 293T Zellen exprimiert. Bei der Analyse des Zelllysats im Immunoblot konnte nur das 37 kDa große Vorläuferprotein (Abb. 20, Spur 2) nachgewiesen werden. Somit konnte die spezifische Spaltung des $\Delta\text{VPg3CL}^{\text{pro}}\Delta\text{3DL}^{\text{pol}}$ Vorläuferproteins in Abhängigkeit der Aktivität des 3CL^{pro} Fragmentes nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde, im Gegensatz zu den Spaltungstests in *E.coli*, das Vorläuferprotein $\Delta\text{VPg3CL}^{\text{pro}}\Delta\text{3DL}^{\text{pol}}$ im eukaryotischen Zellsystem nicht komplett prozessiert.

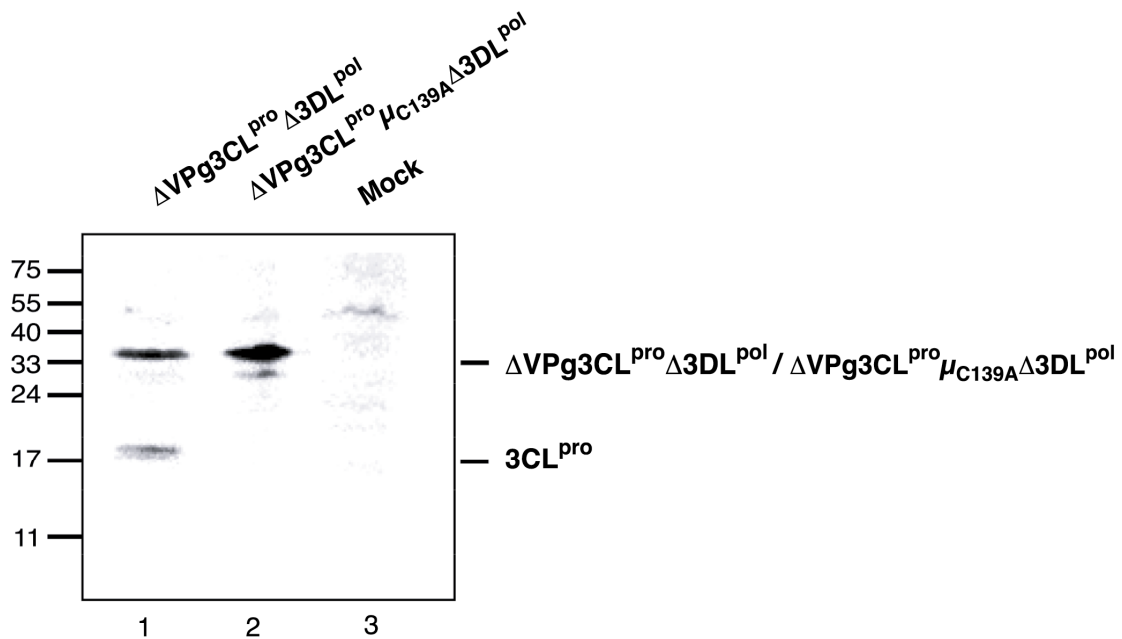


Abbildung 20: Prozessierung des NVII-ORF1 Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ in 293T-Zellen
 293T Zellen wurden mit dem WT-Konstrukt $pUSNORII-\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}IRES$ (Spur 1) und mit dem mutierten Konstrukt $pUSNORII-\Delta VPg3CL^{\mu C139A}\Delta 3DL^{pol}IRES$ (Spur 2) transfiziert. In Spur (3) wurde das Zelllysate der Mock-Kontrolle, bei der die Zellen nur mit dem Plasmid $pIRESneo3$ transfiziert wurde, aufgetrennt. Nach 48 h Proliferationszeit wurden die Zellen, wie unter 2.2.7.6 beschrieben, geerntet. Die Zelllysate wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Prozessierung des Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ durch Immundetektion mit dem polyklonalen rabbit-anti- $3CL^{pro}$ Antikörperserum charakterisiert.

3.2.2 Aufreinigung von $3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}_{\mu E1189A}\Delta 3DL^{pol}$

In dem vorangegangenen Versuch (siehe 3.2.1.1) konnte am Beispiel der Prozessierung eines Vorläuferproteins nachgewiesen werden, dass die Freisetzung der $3CL^{pro}$ aus dem Polyprotein auf der katalytischen Aktivität der $3CL^{pro}$ basiert. In den nun folgenden Experimenten sollte untersucht werden an welchen Spaltmotiven im Polyprotein die $3CL^{pro}$ *in trans* proteolytisch aktiv war. Anhand dieser Ergebnisse sollten Aussagen darüber gemacht werden können, welche der vom *ORF1* kodierten Proteine, aufgrund der proteolytischen *trans*-Aktivität der $3CL^{pro}$ aus dem Polyprotein freigesetzt werden. Möglicherweise ist die Spaltung des vom *ORF1* kodierten Polyproteins nicht nur von der Aktivität der $3CL^{pro}$ abhängig sondern auch von anderen viralen Faktoren, wie z.B. dem Vorläuferprotein $3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$. Denkbar wäre auch, dass $3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ eine andere Spaltspezifität als die alleinige $3CL^{pro}$ besitzt, wie es bei der Prozessierung der Polyproteine von Polioviren der Fall ist (Harris *et al.*, 1992).

Diese These sollte anhand von *in trans* Aktivitätsstudien des mutierten Fusionsproteins 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} überprüft werden, bei dem das putative Spaltmotiv Glutaminsäure/Glycin in das Aminosäuremotiv Glutaminsäure/Alanin umgewandelt wurde, um eine Spaltung zwischen der 3CL^{pro} und der 3DL^{pol} zu verhindern.

3.2.2.1 Aufreinigung des 3CL^{pro} Fragmentes

Voraussetzung für die Durchführung von *trans*-Aktivitätstests mit der 3CL^{pro} war das Vorliegen einer aktiven 3CL^{pro}. Dafür musste zunächst das aus der Spaltung des Vorläuferproteins ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} resultierende 3CL^{pro} Fragment spezifisch aufgereinigt werden (siehe Abb. 18, Spur 4) Zu diesem Zweck wurde zunächst das Vorläuferprotein ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} in *E.coli* BL21DE3 Zellen heterolog exprimiert (siehe 2.2.8.1). Das im Verlauf der Expression durch kotranslationale Spaltung des Vorläufers freigesetzte 3CL^{pro} Fragment wies keinen Affinitätstag mehr auf. Aus diesem Grund konnte es nicht mit Hilfe der Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Stattdessen wurde zur Proteinaufreinigung eine Kombination aus Kationenaustauschchromatographie und Gelfiltration gewählt. Hierfür wurde die 3CL^{pro} zuvor durch eine 75%ige Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert (siehe 2.2.8.4). Nach einem anschließenden Dialyseschritt (siehe 2.2.8.5), bei dem die NaCl-Ionen aus dem Lysat entfernt wurden, konnte die Kationenaustauschchromatographie (siehe 2.2.9.1) durchgeführt werden. Das so vorgereinigte Proteinlysate wurde entsprechend der Proteinmolekulargewichte in einem Gelfiltrationsschritt separiert (siehe 2.2.9.3). Die FPLC-Fraktionen 61 - 68 (Abb. 21 A), in denen Proteine detektiert wurden, wurden im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 21 B). Durch Coomassiefärbung konnte nachgewiesen werden, dass die 19 kDa große 3CL^{pro} in den Fraktionen 63 - 67 eluiert wurde und sauber von den übrigen im Lysat vorliegenden Proteinen getrennt wurde.

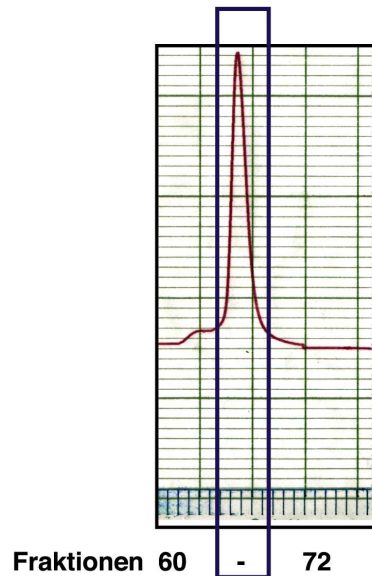
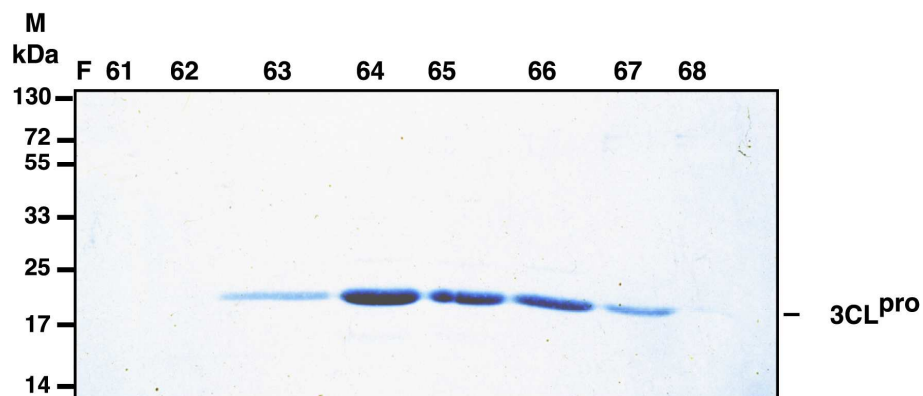
A**B**

Abbildung 21: Aufreinigung des aus dem Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$ freigesetzten $3CL^{pro}$ Fragmentes

Infolge der heterologen Expression des NV-Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro} \Delta 3DL^{pol}$ wurde das Proteinlysate geerntet (siehe 2.2.8.1, 2.2.8.2, 2.2.8.4) und nach *ü. N.*-Dialyse (siehe 2.2.8.5) des Lysates wurde das Proteingemisch mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie (siehe 2.2.9.1) unter Verwendung der FPLC (HiTrapTM SP FF 5 ml column; GE HEALTHCARE) vorgereinigt. Abschließend wurden die Proteine durch eine Gelfiltration (siehe 2.2.9.3), unter Verwendung der FPLC (GPC column HiLoad 16/60 Superdex 75pg; GE HEALTHCARE), separiert.

(A) Die während der Gelfiltration eluierten Proteine wurden fraktioniert. Parallel dazu wurde in einem Chromatogramm die Absorption der Eluate bei 280 nm dargestellt.

(B) Die Fraktionen (F), in denen Proteine detektiert wurden, wurden in der SDS-Page aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert. Als Größenstandard wurde ein Proteinmarker (M) mitgeführt.

3.2.2.2 Aufreinigung des Fusionsproteins $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$

Für die Aufreinigung des Fusionsproteins $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ wurde zunächst die kodierende Sequenz für $3CL^{pro}3DL^{pol}$ sowie das 3'-terminale Ende der kodierenden Sequenz des 5'-seitig lokalisierten VPg-Proteins in den Vektor pet28b kloniert. Dabei erfolgte eine C-terminale *in frame* Fusion mit einem 6xHis Tag. Um eine kotranslationale Prozessierung zwischen der $3CL^{pro}$ und der $3DL^{pol}$ zu verhindern, wurde anschließend in dem resultierenden Plasmid pUSNORII- $\Delta VPg3CL^{pro}3DL^{pol}ET28b$, mit Hilfe der *site directed mutagenesis*, das Glutaminsäurekodon des Spaltmotivs zwischen der $3CL^{pro}$ und der $3DL^{pol}$ in ein Alaninkodon mutiert und somit das Plasmid pUSNORII- $\Delta VPg3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}ET28b$ generiert (Abb. 22).

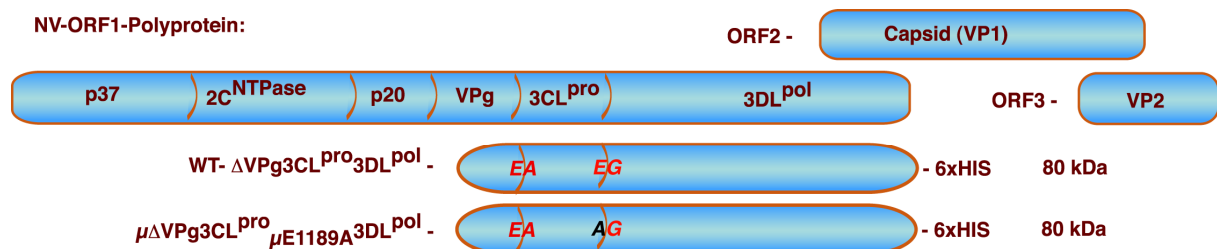


Abbildung 22: Schematische Darstellung des ORF1 Fusionsproteins $\Delta VPg3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$

Das NVII-ORF1 Fusionsprotein $\Delta VPg3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ umfasste die komplette Sequenz von $3CL^{pro}3DL^{pol}$. N-terminal wurde das Fusionsprotein von den 60 C-terminalen Aminosäuren des VPg Proteins flankiert. Das Spaltmotiv E/G zwischen der $3CL^{pro}$ und der $3DL^{pol}$ wurde mit Hilfe der *site directed mutagenesis* (QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit; STRATAGENE) in die Aminosäuresequenz A/E umgewandelt. Das mutierte Fusionsprotein $\Delta VPg3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ wurde in dieser Abbildung im Vergleich zum wt-Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro}3DL^{pol}$ und zum ORF1-Polyprotein dargestellt.

Nach der Expression des im Spaltmotiv mutierten Fusionsproteins $\Delta VPg3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ in *E.coli*, wurde im Immunoblot, unter Verwendung des anti- $3CL^{pro}$ Serums, weiterhin ein Proteolyseprodukt nachgewiesen, das das $3CL^{pro}$ Fragment aufwies. Die Expression eines proteolytisch inaktiven Fusionsproteins $\Delta VPg3CL^{pro}_{C139AE1189A}3DL^{pol}$, das eine Mutation im aktiven Zentrums der $3CL^{pro}$ aufwies, führte ebenfalls zur Freisetzung des $3CL^{pro}$ Fragmentes (siehe Anhang 1). Dieses Ergebniss zeigte, dass bakterielle Proteasen für eine unspezifische Prozessierung des Fusionsproteins verantwortlich sind. Dies hatte zur Folge, dass der Anteil des unprozessierten Fusionsproteins $3CL^{pro}_{E1189A}3DL^{pol}$ im Zelllysats relativ gering war. Für die Aufreinigung von $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ hatte dies zur Konsequenz, dass ein großes Volumen einer *E.coli* BL21DE3 Kultur, die mit pUSNORII- $\Delta VPg3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}ET28b$

transformiert wurde, exprimiert werden musste (siehe 2.2.8.1). Die Zellen einer 4 l *E.coli* Expressionskultur wurden mit Hilfe von Aluminiumoxyd in einem Mörser aufgeschlossen (siehe 2.2.8.3) und ihr Zelllysate durch anschließende Ultrazentrifugation gewonnen. Der erste Aufreinigungsschritt des Zelllysates erfolgte mit Hilfe der Metallchelate-Affinitätschromatographie (siehe 2.2.9.2). Dabei wurden die Fusionsproteine $3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$ über den His-Tag an eine Ni^{2+} Säule gebunden und anschließend durch Imidazol eluiert. Die Fusionsproteine $3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$ wurden in einem zweiten Aufreinigungsschritt, der Gelfiltration (siehe 2.2.9.3), von den übrigen Proteinen des Eluats separiert (Abb. 23). Das geschätzte Molekulargewicht des gereinigten Fusionsproteins betrug 72 kDa. Dieses Molekulargewicht weist darauf hin, dass die $3CL^{pro}$ an dem Spaltmotiv E/A zwischen dem VPg Protein und der $3CL^{pro}$ proteolytisch aktiv war und die N-terminalen 59 aa vom Fusionsprotein abgespalten wurden.

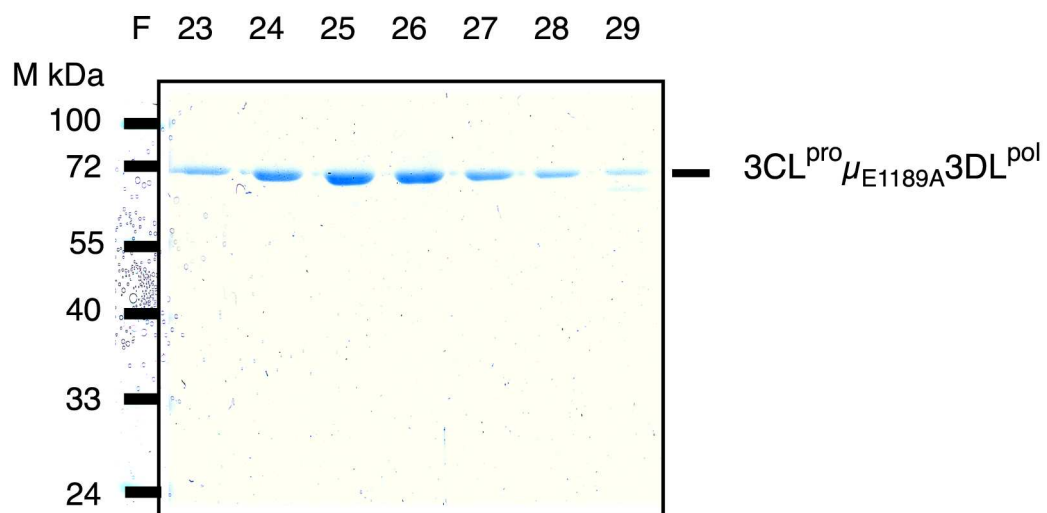


Abbildung 23: Aufreinigung des Fusionsproteins $3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$

Infolge der heterologen Expression des NV-Fusionsproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$ wurde das Proteinlysate geerntet (siehe 2.2.8.1, 2.2.8.3). Ein erster Aufreinigungsschritt erfolgte mit Hilfe der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie unter Verwendung der FPLC (HisTrapTM FF crud; GE HEALTHCARE). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurden die Proteine durch eine Gelfiltration unter Verwendung der FPLC (GPC column HiLoad 16/60 Superdex 75pg; GE HEALTHCARE) nochmals separiert und fraktioniert gesammelt. Parallel dazu wurde eine Absorptionmessung bei 280 nm durchgeführt. Die Fraktionen, in denen Proteine im Verlauf der Gelfiltration detektiert wurden, wurden in der SDS-Page aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert.

3.2.3 Untersuchung zur *trans* Spaltaktivität von 3CL^{pro} und dem Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol}

An welchen Aminosäuremotiven innerhalb des Polyproteins die 3CL^{pro} in *trans* proteolytisch aktiv war, sollte anhand einer Spaltungsanalyse von fünf kommerziell bezogenen Peptiden untersucht werden. Die verwendeten Peptide präsentierten die Spaltmotive innerhalb des Polyproteins (Abb. 24). Die Peptide p37/2C^{NTPase} (1) und 2C^{NTPase}/p20 (2) wiesen in ihrer Aminosäuresequenz in Position P1P1' das Spaltmotiv Q/G auf. Die Aminosäuresequenz des Peptids p20/VPg (3) enthielt das Spaltmotiv E/G in Position P1P1'. Das Peptid VPg/3CL^{pro} (4) umfasste die Aminosäuren E/A an Position P1P1' und das Peptid 3CL^{pro}/3DL^{pol} (5) die Aminosäuren E/G als Spaltmotiv in Position P1P1'.

ORF1-Polyprotein:



Abbildung 24: Aminosäuresequenz der Peptide, die die authentischen Spaltmotive des Polyproteins präsentierten

Peptid 1: p37/2C^{NTPase}, Peptid 2: 2C^{NTPase}/p20, Peptid 3: p20/VPg, Peptid 4: VPg/3CL^{pro}, Peptid 5: 3CL^{pro}/3DL^{pol}. Die Spaltmotive in Position P1P1' sind **hervorgehoben** gekennzeichnet. Die Peptide wurden in Bezug zum ORF1 Polyprotein dargestellt.

3.2.3.1 In *trans* Prozessierung von p37/2C^{NTPase} durch 3CL^{pro}

In einem ersten Spaltungsansatz wurde die zuvor gereinigte 3CL^{pro} (siehe 3.2.2.1) mit dem Peptid p37/2C^{NTPase} bei 30 °C für 17 Stunden inkubiert. Die Spaltung wurde anschließend mit Hilfe der HPLC analysiert und in einem Chromatogramm dargestellt. Als Negativkontrolle wurde das Peptid alleine inkubiert und ebenfalls mit Hilfe der HPLC analysiert. Die Separation des Peptids p37/2C^{NTPase} (S) war durch eine Retentionszeit von ca. 25 Minuten charakterisiert (Abb. 25 A). Die HPLC-Analyse des eigentlichen Spaltungsansatzes (Abb. 25 B) dokumentierte zusätzlich zum Substratpeak (S) zwei weitere Peaks P1 und P2, die zu einem früheren Zeitpunkt im Verlauf der *reversed-phase* Chromatographie eluiert wurden. Bei diesen beiden Peaks handelte es sich um Spaltprodukte des Peptids p37/2C^{NTPase}.

Für die Negativkontrolle wurde das leere Plasmid pET28b in BL21DE3 Zellen exprimiert und identisch zur 3CL^{pro} aufgereinigt (siehe 3.2.2.1). Die Gelfiltrationsfraktionen 63-67 wurden gepoolt und für einen Spaltungsassay mit dem Peptid eingesetzt. Anhand der HPLC-Analyse der Negativkontrolle (Abb. 25 C) konnte keine Spaltung von p37/2C^{NTPase} nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis verweist darauf, dass eine Spaltung von p37/2C^{NTPase} auf die Aktivität der 3CL^{pro} zurückzuführen ist und nicht auf die Aktivität von eventuell im Eluat vorhandenen bakteriellen Proteasen.

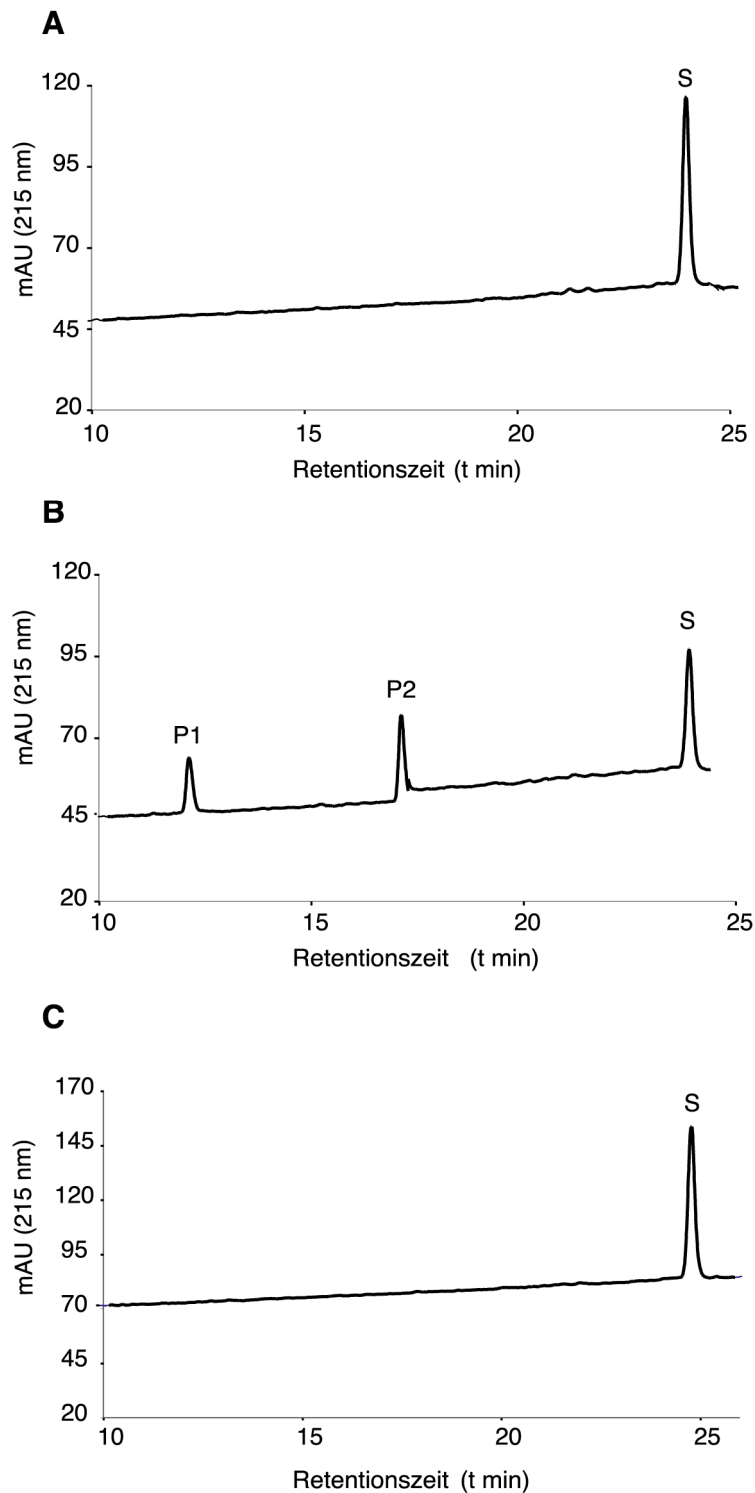


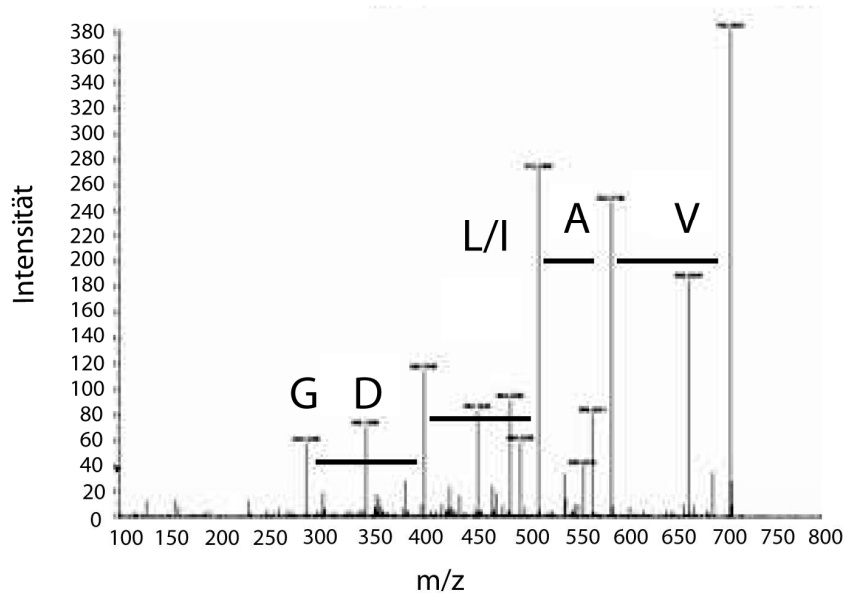
Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm zur Spaltungsanalyse des Peptids $p37/2C^{NTPase}$

(A) Kontrollanalyse des Peptids $p37/2C^{NTPase}$; (B) Auftrennung des Spaltungsansatzes $p37/2C^{NTPase} + 3CL^{pro}$ (C) Eluat der Negativkontrolle + $p37/2C^{NTPase}$

Alle Ansätze wurden durch reversed-phase Chromatographie (YMCPack ODS-AQ column, YMC Europe) mit Hilfe der HPLC (Äkta purifier, AMERSHAM BIOSCIENCES) analysiert. Die Elution der Peptide wurde durch eine Absorptionsmessung bei 215 nm erfasst. Der Bereich der maximalen Absorption bei 215 nm wurde integriert (mAU) und gegen die Retentionszeit (t min) in einem Chromatogramm dargestellt (Software: Unicorn 2.10). Der Substratpeak wurde mit S gekennzeichnet und die beiden Spaltprodukte mit P1 und P2.

Für die Identifizierung des Spaltmusters des Peptids p37/2C^{NTPase} wurden die Spaltprodukte P1 und P2 fraktioniert gesammelt und massenspektrometrisch (MassSpectrometry Facility, MPI-CBG, Dresden) analysiert (Abb. 26). Für das erste Proteolyseprodukt P1 konnte die MALDI MS Analyse kein exaktes Molekulargewicht berechnen. Aus diesem Grund wurde eine ESI-MS und MS/MS Analyse zur Bestimmung der Peptidsequenz durchgeführt, die für das Spaltfragment P1 die Sequenz GDLAV (Abb. 26 A) nachwies. Die Berechnung des Molekulargewichts für das Proteolysefragment P2 durch die MALDI MS Analyse ergab einen Wert von 950.341 Da. Diese Größe entspricht dem Molekulargewicht des Fragmentes LLGDYELQ (Abb. 26 B). Anhand dieser Daten konnte nachgewiesen werden, dass das Peptid p37/2C^{NTPase} tatsächlich an dem putativen Spaltemotiv Q/G prozessiert wurde.

A



B

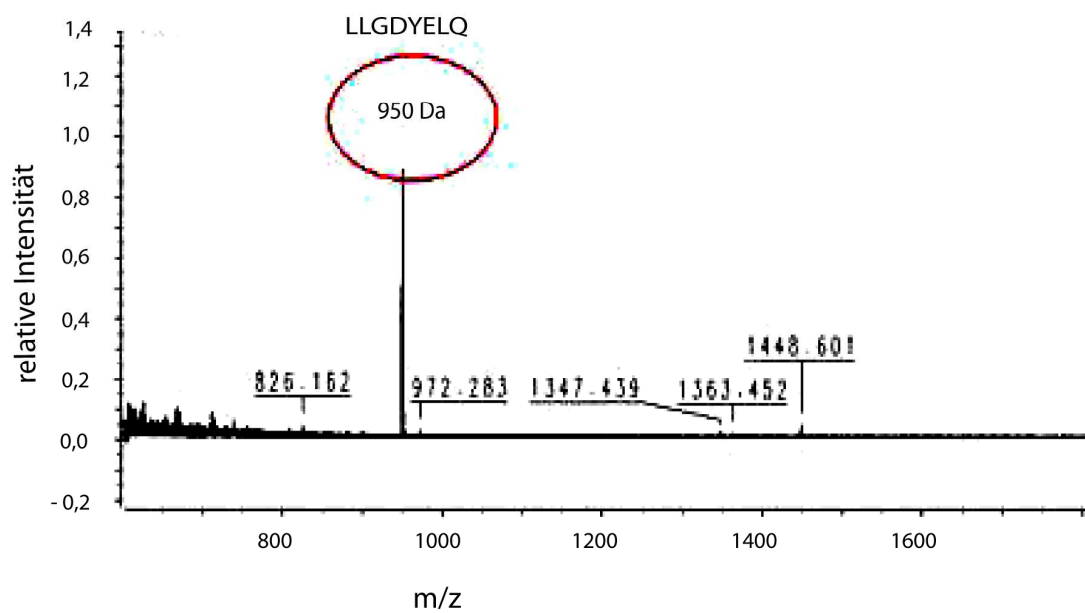


Abbildung 26: Massenspektrometrische Analyse der Spaltfragmente P1 und P2 des Peptids p37/2C^{NTPase}

Die durch die Spaltung des Peptids p37/2C^{NTPase} resultierenden Spaltprodukte P1 und P2 wurden im Verlauf der reversed-phase Chromatographie fraktioniert und anschließend massenspektrometrisch analysiert (siehe 2.2.10.8.2) (A) Das Fragment P1 wurde durch NanoESI-MS und MS/MS Fragmentierung, unter Verwendung des Massenspektrometers (QSTAR Pulsar I, MDS Sciex, Concord, Canada), analysiert. (B) Das Spaltprodukt P2 wurde durch Maldi-MS, ebenfalls unter Verwendung des Massenspektrometers (QSTAR Pulsar I, MDS Sciex, Concord, Canada) analysiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software BioAnalyst QS v.1 (MDS Sciex, Concord, Canada).

3.2.3.2 *In trans* Prozessierung des Spaltmotiv $2C^{NTPase}/p20$ durch $3CL^{pro}$

Im nachfolgenden *trans*-Spaltungsassay sollte untersucht werden, ob die $3CL^{pro}$ das Peptid $2C^{NTPase}/p20$ prozessiert. Der Versuchsablauf sowie die Spaltungsanalyse erfolgte analog zum Versuch 3.2.3.1. Die Retentionszeit des aufgetrennten Peptids $2C^{NTPase}/p20$ (S) im Verlauf der HPLC-Analyse betrug ca. 25 min (Abb. 27 A). Die HPLC-Analyse des eigentlichen Spaltungsassays zeigte, dass zu einem früheren Zeitpunkt als das unprozessierte Peptid (S) zwei Produkte (P1 und P2) eluiert wurden (Abb. 27 B), die die Spaltprodukte des Peptids $2C^{NTPase}/p20$ darstellten. Interessanterweise konnte im Gegensatz zur Spaltung des Peptids $p37/2C^{NTPase}$ (3.2.3.1), das Peptid $2C^{NTPase}/p20$ unter den gleichen Versuchsbedingungen fast komplett prozessiert werden. Im Spaltungsassay, der mit dem Eluat der aufgereinigten Negativkontrolle (Abb. 27 C) durchgeführt wurde, konnte eine Spaltung des Peptides $2C^{NTPase}/p20$ nicht nachgewiesen werden. Demnach basiert auch die Spaltung von $2C^{NTPase}/p20$ auf der spezifischen $3CL^{pro}$ *trans* Aktivität.

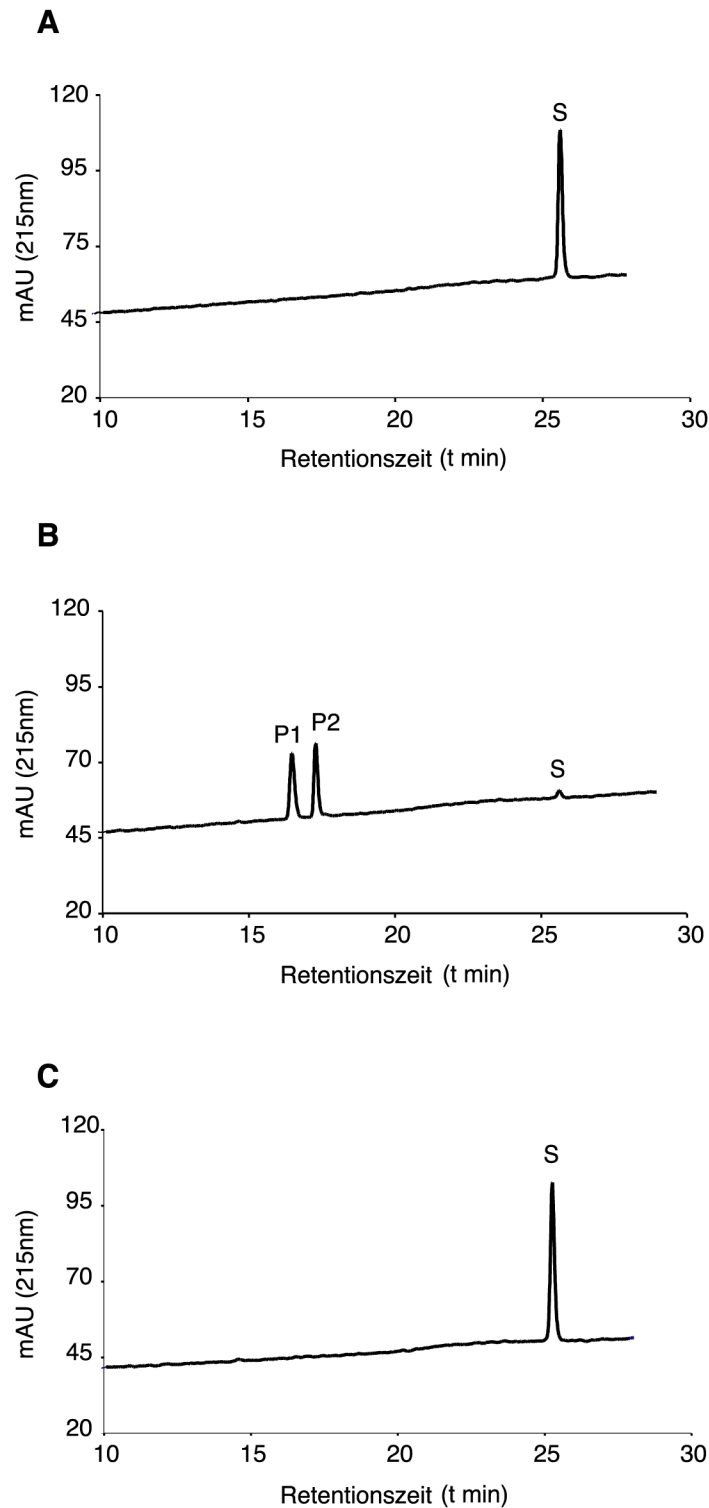


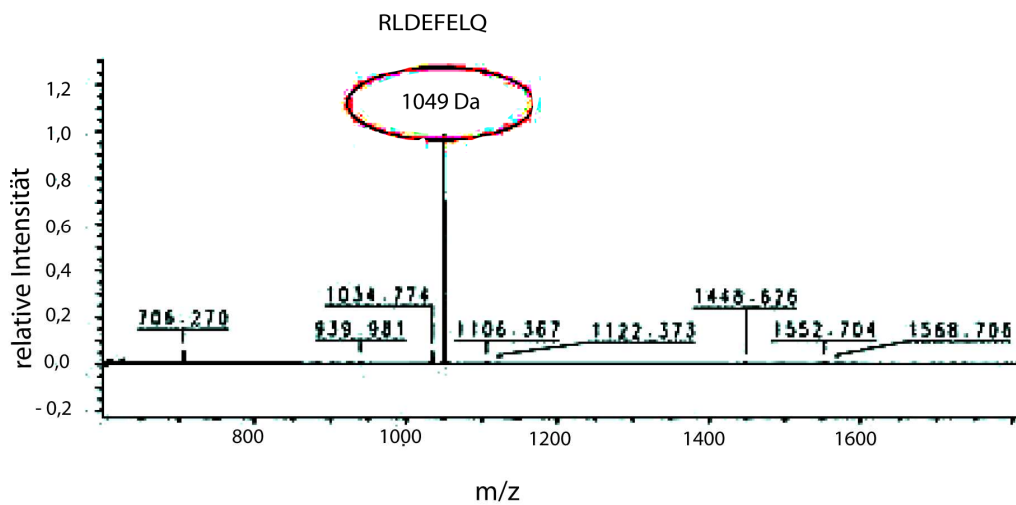
Abbildung 27: HPLC-Chromatogramme zur Spaltungsanalyse des Peptids $2C^{NTPase}/p20$

(A) Kontrollanalyse des Peptids $2C^{NTPase}/p20$; (B) Auftrennung des Spaltungsansatzes $2C^{NTPase}/p20 + 3CL^{pro}$, (C) Eluat der Negativkontrolle + $2C^{NTPase}/p20$

Alle Ansätze wurden durch reversed-phase Chromatographie (YMCPack ODS-AQ column, YMC Europe) mit Hilfe der HPLC (Äkta purifier, AMERSHAM BIOSCIENCES) analysiert. Die Elution der Peptide wurde durch eine Absorptionsmessung bei 215 nm erfasst. Der Bereich der maximalen Absorption bei 215 nm wurde integriert (mAU) und gegen die Retentionszeit (t min) in einem Chromatogramm dargestellt (Software: Unicorn 2.10). Der Substratpeak wurde mit S gekennzeichnet und die beiden Spaltprodukte mit P1 und P2.

Die massenspektrometrische Analyse (MassSpectrometry Facility, MPI-CBG, Dresden) der Spaltprodukte des Peptids 2C^{NTPase}/p20, P1 und P2, berechnete für das Fragment P1 ein Molekulargewicht von 1049.561 Da. Dieses Molekulargewicht entsprach der Aminosäuresequenz RLDEFELQ (Abb. 28 A). Für das Spaltfragment P2 konnte ein Molekulargewicht von 706.27 Da berechnet werden, das der Aminosäuresequenz GPALTTF zugeordnet werden konnte (Abb. 28 B). Diese Daten verwiesen darauf, dass auch das Peptid 2C^{NTPase}/p20 an dem Aminosäuremotiv Q/G in der Position P1P1' in *trans* durch die 3CL^{pro} prozessiert wurde.

A



B

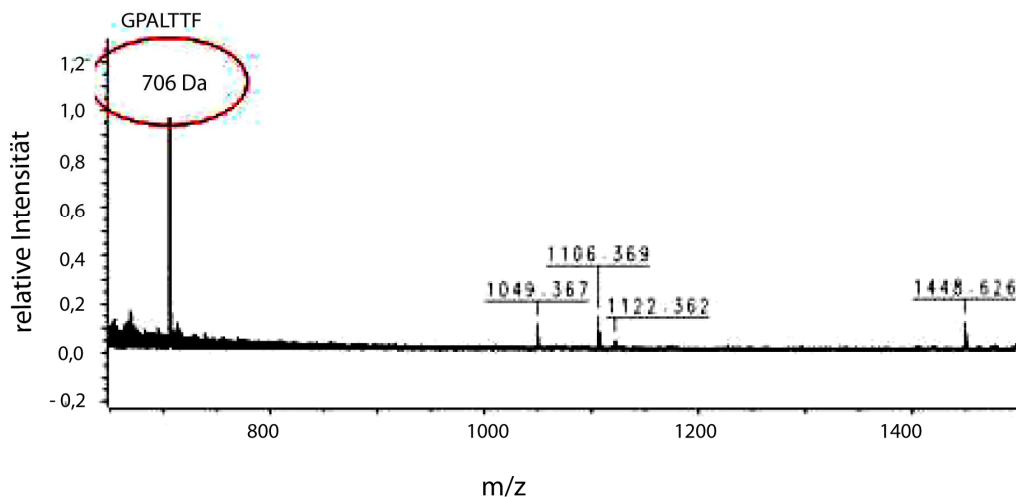


Abbildung 28: Massenspektrometrische Analyse der Spaltprodukte des Peptids 2C^{NTPase}/p20

Die Spaltprodukte P1 und P2 des Peptids 2C^{NTPase}/p20 wurden fraktioniert und durch Maldi-MS Analyse unter Verwendung des Massenspektrometers (QSTAR Pulsar I, MDS Sciex, Concord, Canada) ausgewertet (siehe 2.2.10.8.2).

(A) MS-Spektrum des Spaltproduktes P1. (B) MS-Spektrum des Spaltproduktes P2.

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software BioAnalyst QS v.1 (MDS Sciex, Concord, Canada).

3.2.3.3 *Trans*-Spaltungsassays zur Analyse der Prozessierung von p20/VPg, VPg/3CL^{pro} und 3CL^{pro}/3DL^{pol} durch 3CL^{pro}

Die Prozessierung der Peptide p20/VPg, VPg/3CL^{pro} und 3CL^{pro}/3DL^{pol} durch die 3CL^{pro} sollte ebenfalls mit Hilfe des *trans*-Spaltungsassays untersucht werden. Nach 17-stündiger Inkubation des Ansatzes wurde die Prozessierung durch *reversed-phase* Chromatographie untersucht. In den Kontrollansätzen wurden die Peptide ohne Zugabe der 3CL^{pro} inkubiert und anschließend mit Hilfe der HPLC analysiert (p20/VPg: Abb. 29 A; VPg/3CL^{pro}: Abb. 29 C; 3CL^{pro}/3DL^{pol}; Abb. 29 E). Anhand der HPLC-Chromatogramme konnten in den eigentlichen Spaltungsansätzen der Peptide p20/VPg (Abb. 29 B), VPg/3CL^{pro} (Abb. 29 D) und 3CL^{pro}/3DL^{pol} (Abb. 29 F) jeweils nur die Peaks der Ausgangssubstrate detektiert werden. Zusätzliche Peaks eventueller Spaltprodukte waren nicht nachweisbar.

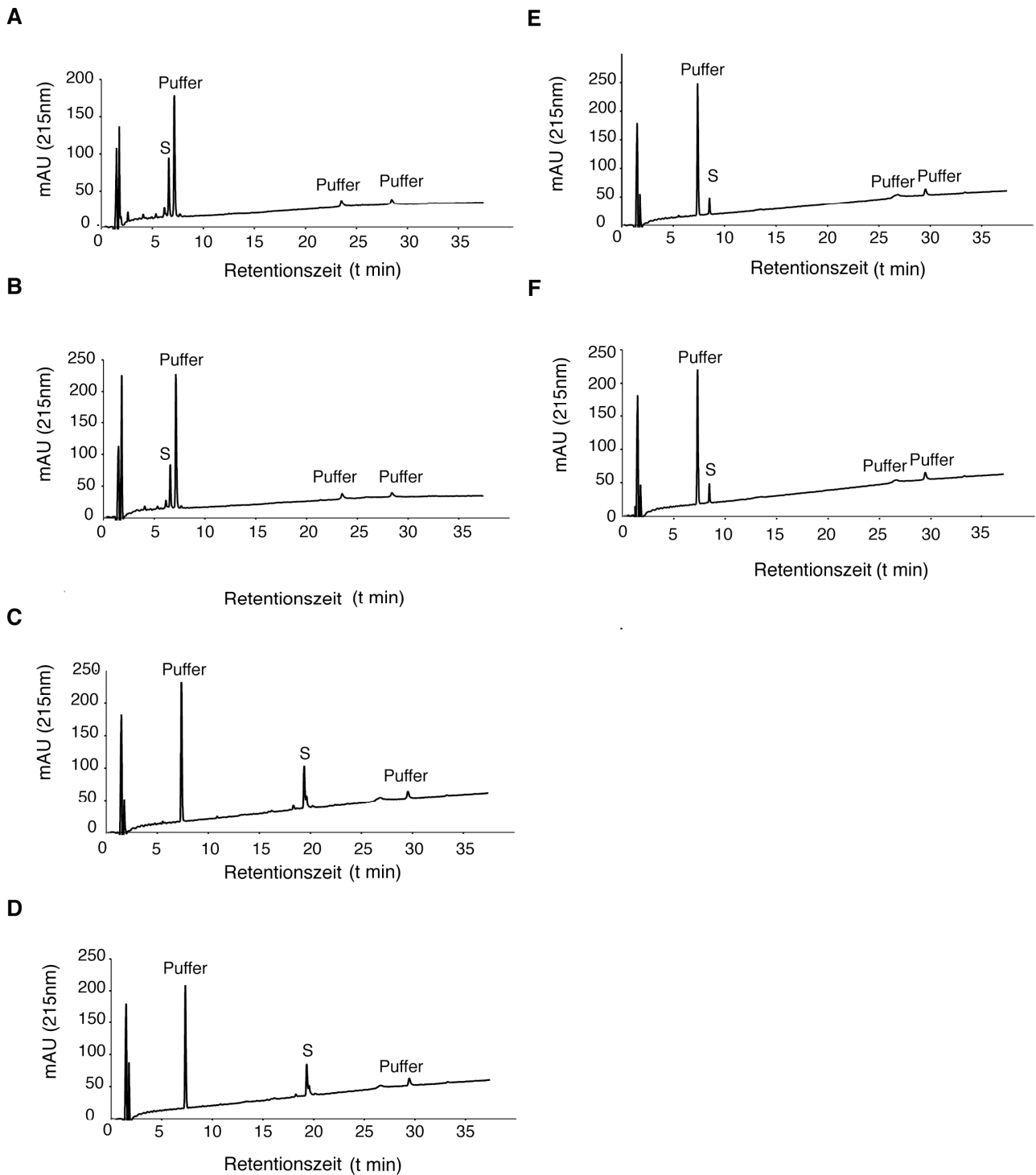


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramme zur Spaltanalyse der Peptide p20/VPg, VPg/3CL^{pro} und 3CL^{pro}/3DL^{pol}

Sowohl die Peptide allein, als auch die trans-Spaltungsansätze wurden durch die reversed-phase Chromatographie (YMCPack ODS-AQ column, YMC Europe) mit Hilfe der HPLC (Äkta purifier, AMERSHAM BIOSCIENCES) analysiert. Die Elution der Peptide wurde durch eine Absorptionsmessung bei 215 nm erfasst. Der Bereich der maximalen Absorption bei 215 nm wurde integriert (mAU) und gegen die Retentionszeit (t min) in einem Chromatogramm dargestellt (Software: Unicorn 2.10). Die Substratpeaks wurden mit S gekennzeichnet und die Spaltprodukte mit P1 und P2.

(A) p20/VPg (B) p20/VPg + 3CL^{pro}; (C) VPg/3CL^{pro} (D) VPg/3CL^{pro} + 3CL^{pro}; (E) 3CL^{pro}/3DL^{pol}; (F) 3CL^{pro}/3DL^{pol} + 3CL^{pro}

3.2.3.4 *In trans*-Spaltungstests mutierter Peptide

Für die Prozessierung des Poliovirus-Polyproteins konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur die Position P1 die Spaltspezifität der $3CL^{pro}$ bestimmt, sondern auch die Positionen P2 und P3 eine wichtige Rolle bei der Prozessierung spielen (Pallai *et al.*, 1989). Aus diesem Grund wurde in Rahmen dieser Arbeit ein mutiertes NV-p20/VPg μ TP2L Peptid synthetisiert, das an Position P2 einen Leucinrest anstatt des ursprünglichen Threoninrestes aufwies (siehe Tab. 3; 2.1.10). Durch Einführung dieser Mutation ist das Peptid VPg/p20 μ TP2L in Position P2 zu den von $3CL^{pro}$ prozessierten Peptiden p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20 identisch. Das mutierte Peptid $3CL^{pro}$ /3DL^{pol}TP3E enthielt in der Position P3 einen Glutaminsäurerest anstatt des originalen Threoninrestes und entsprach somit in Position P3 den prozessierten Peptiden p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20. Die Prozessierung der Peptide p20/VPg μ TP2L und $3CL^{pro}$ /3DL^{pol}TP3E wurde ebenfalls unter Anwendung des $3CL^{pro}$ abhängigen *trans*-Spaltungsassays untersucht. Allerdings ermöglichten auch die Aminosäureveränderungen an der P2 Position des Peptids p20/VPg μ TP2L (Abb. 30 A+B) bzw. an der P3 Position des Peptids $3CL^{pro}$ /3DL^{pol}TP3E (Abb. 30 C+D) keine Spaltung durch $3CL^{pro}$.

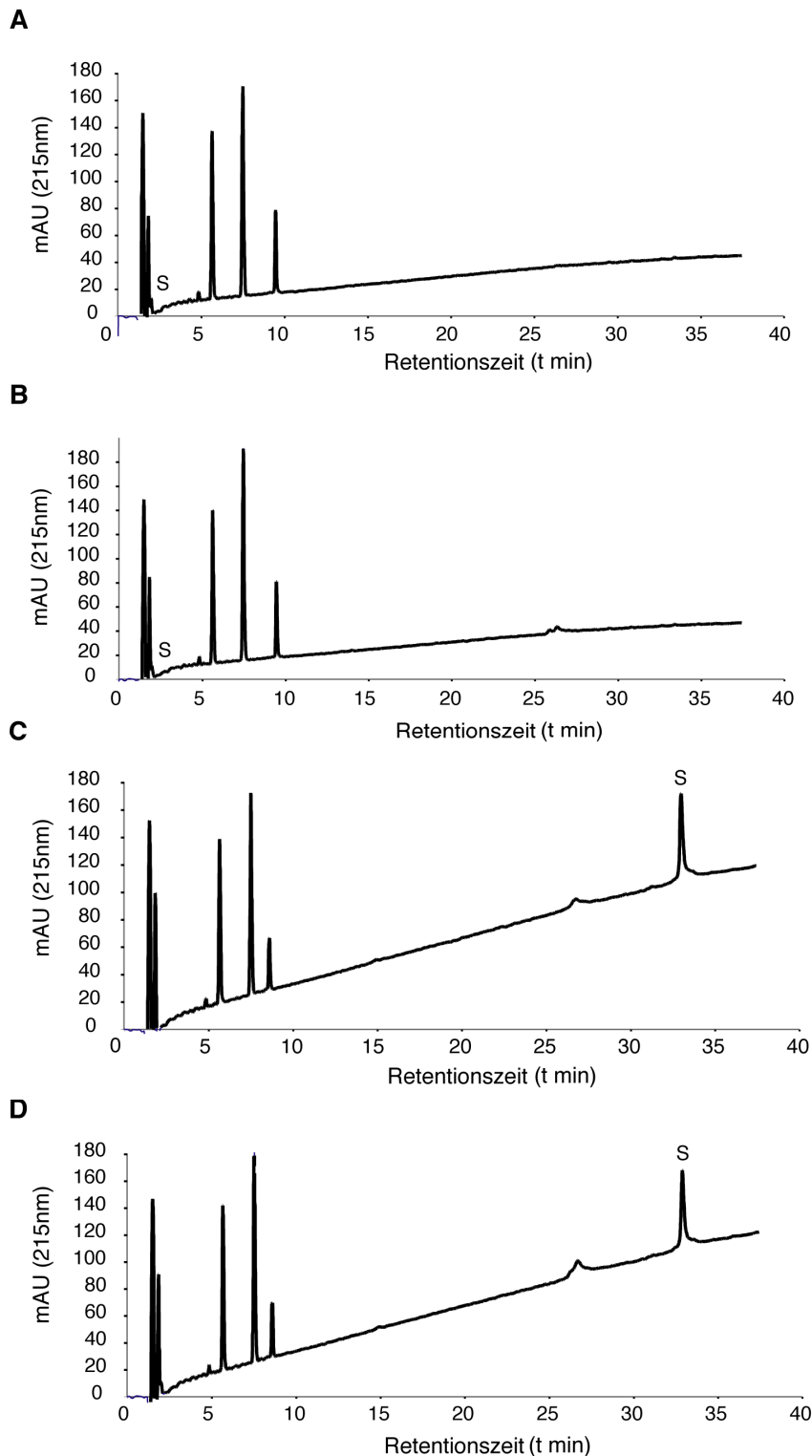


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramme zur Spaltungsanalyse der mutierten Peptide VPg/p20 μ TP2L und 3CL^{pro}/3DL^{pol}TP3E

(A) Kontrollanalyse des Peptids p20/VPg μ TP2L; (B) Auftrennung des Spaltungsansatzes p20/VPg μ TP2L+3CL^{pro}, (C) Kontrollanalyse des Peptids 3CL^{pro}/3DL^{pol}TP3E, (D) Auftrennung des Spaltungsansatzes 3CL^{pro}/3DL^{pol}TP3E+3CL^{pro}. Alle Ansätze wurden durch reversed-phase Chromatographie (YMC-Pack ODS-AQ column, YMC Europe) mit Hilfe der HPLC (Äkta purifier, AMERSHAM BIOSCIENCES) analysiert. Die Elution der Peptide wurde durch eine Absorptionsmessung bei 215 nm erfasst. Der Bereich der maximalen Absorption bei 215 nm wurde integriert (mAU) und gegen die Retentionszeit (t min) in einem Chromatogramm dargestellt (Software: Unicorn 2.10). Die Substratpeaks wurden mit S gekennzeichnet.

Die Versuche zur Analyse der *trans* Spaltungsspezifität der 3CL^{pro} wiesen nach, dass nur die Peptide p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20, die das Aminosäuremotiv Q/G als Spaltmotiv aufwiesen, von 3CL^{pro} in *trans* prozessiert wurden. Anhand dieser Ergebnisse konnte eine strikte Affinität der 3CL^{pro} zur Aminosäuresequenz Q/G als Spaltmotiv in der P1P1' Position postuliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Peptide, die ein E/G Spaltmotiv (p20/VPg, 3CL^{pro}/3DL^{pol}) bzw. ein E/A Spaltmotiv (VPg/3CL^{pro}) in Position P1P1' aufwiesen, nicht von der 3CL^{pro} gespalten wurden. Eine Prozessierung durch 3CL^{pro} erfolgte auch dann nicht, wenn die Position P2 bzw. P3 durch Mutationen so verändert wurde, dass sie denen der gespaltenen Peptide entsprach.

3.2.3.5 *In trans* Aktivität des Fusionsproteins 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} an den Spaltmotiven p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20

In den vorangegangenen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die 3CL^{pro} alleine in *trans* nur an dem Spaltmotiv Q/G proteolytisch aktiv war. Möglicherweise ist die Spaltung der übrigen Spaltmotive von dem Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} abhängig, das eine andere Spaltspezifität als die 3CL^{pro} aufweist.

Um zunächst zu überprüfen ob das im Rahmen dieser Arbeit gereinigte 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol}-Fusionsprotein (siehe 3.2.2.2), bei dem das Spaltmotiv Glu/Gly zwischen der 3CL^{pro} und der 3DL^{pol} in das Motiv Glu/Ala umgewandelt wurde, proteolytisch aktiv war, wurde das Fusionsprotein mit den Peptiden p37/2C^{NTPase} bzw. 2C^{NTPase}/p20 für 17 h bei 30 °C inkubiert. Die sich anschließende Analyse der Spaltansätze mit Hilfe der *reversed-phase* Chromatographie zeigte zusätzlich zu den Substratpeaks p37/2C^{NTPase} (Abb. 31 A, S1) und 2C^{NTPase}/p20 (Abb. 31 C, S2) zwei weitere Peaks P1 und P2 (Abb. 31 B) bzw. P3 und P4 (Abb. 31 D).

Dieses Ergebnis zeigte, dass das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} ebenfalls eine proteolytische *trans*-Aktivität aufwies. Die Retentionszeiten der Spaltprodukte von p37/2C^{NTPase} und p37/2C^{NTPase} in der *reversed phase* Chromatographie waren identisch zu den Retentionszeiten der Spaltprodukte aus den 3CL^{pro} *trans*-Spaltungsassays (Abb. 25 B, 27 B). Aus diesem Grund war anzunehmen, dass die Prozessierung der Peptide durch 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} ebenfalls an dem Spaltmotiv Q/G stattfand.

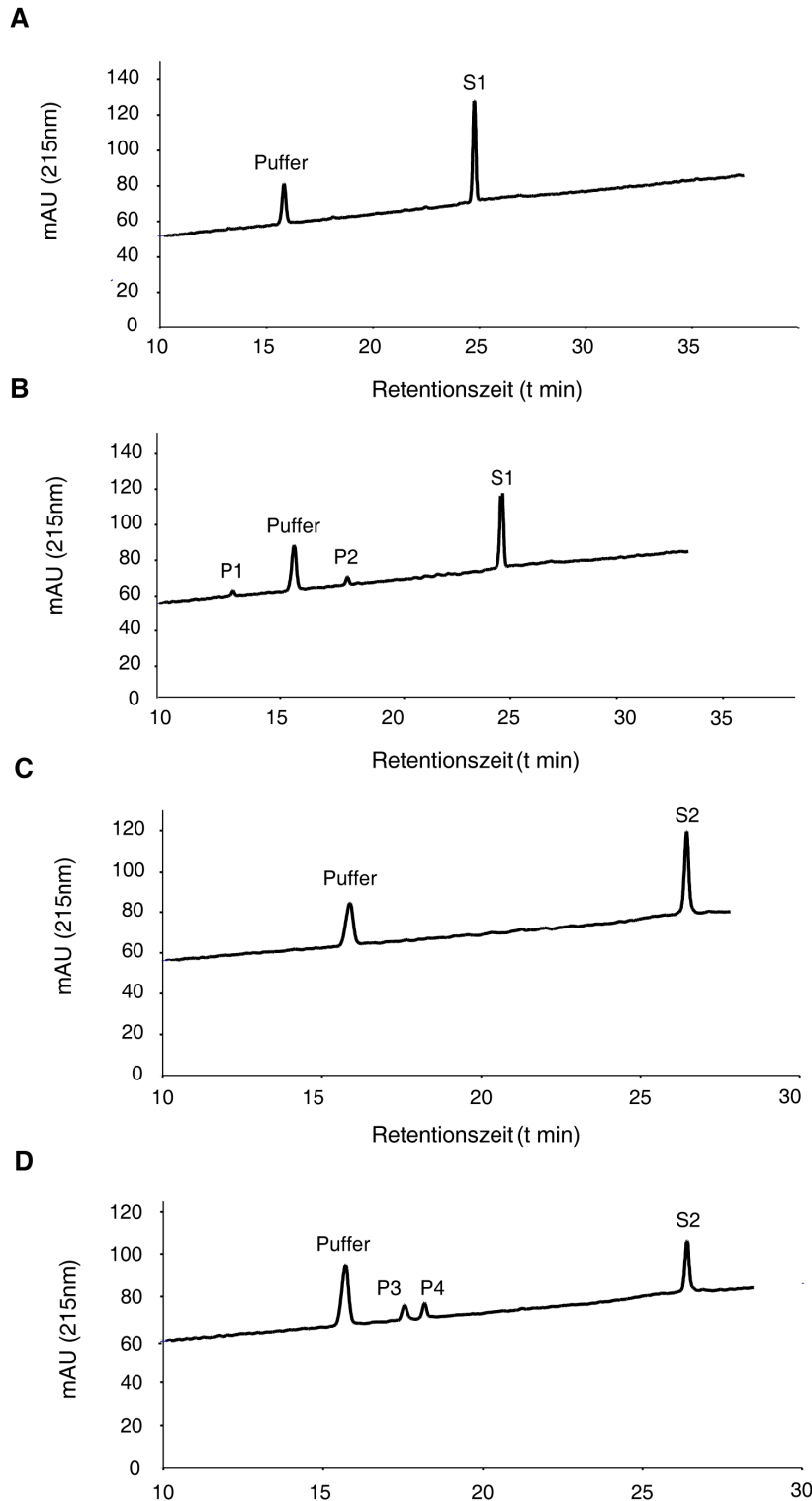


Abbildung 31: HPLC-Chromatogramme zur Untersuchung der trans-Spaltaktivität des Fusionsproteins $3CL^{pro}_{\mu E1189A} 3DL^{pol}$ an den Peptiden $p37/2C^{NTPase}$ und $2C^{NTPase}/p20$

Sowohl die Peptide allein als auch die trans-Spaltungsansätze wurden durch die reversed-phase Chromatographie (YMCPack ODS-AQ column, YMC Europe) mit Hilfe der HPLC (Äkta purifier, AMERSHAM BIOSCIENCES) analysiert. Die Elution der Peptide wurde durch eine Absorptionsmessung bei 215 nm erfasst. Der Bereich der maximalen Absorption bei 215 nm wurde integriert (mAU) und gegen die Retentionszeit (t min) in einem Chromatogramm dargestellt (Software: Unicorn 2.10). Die Substratpeaks wurden mit S gekennzeichnet und die jeweils beiden Spaltprodukte mit P1 und P2.

(A) $p37/2C^{NTPase}$ (S1); (B) $p37/2C^{NTPase} + 3CL^{pro}_{\mu E1189A} 3DL^{pol}$: Spaltprodukte wurden durch P1 und P2 markiert; (C) $2C^{NTPase}/p20$ (S2); (D) $2C^{NTPase}/p20 + 3CL^{pro}_{\mu E1189A} 3DL^{pol}$: Spaltprodukte wurden durch P3 und P4 gekennzeichnet

3.2.3.6 Prozessierung des Spaltmotivs VPg/3CL^{pro} durch das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol}

Aus den vorangegangenen Versuchen ergab sich die Fragestellung, ob die Peptide die von 3CL^{pro} *in trans* nicht prozessiert wurden, möglicherweise von dem Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} im *trans*-Spaltungsassays (siehe 2.2.10.3) gespalten werden konnten. Untersuchungen zur Prozessierung der Peptide p20/VPg und 3CL^{pro}/3DL^{pol} durch das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} zeigten, dass diese Peptide auch nicht von 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} gespalten wurden (Abb. 32). Demnach konnte das Spaltmotiv Glutaminsäure/Glycin (E/G), das die beiden Peptide p20/VPg und 3CL^{pro}/3DL^{pol} aufweisen, weder von 3CL^{pro} allein noch durch das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} *in trans* prozessiert werden.

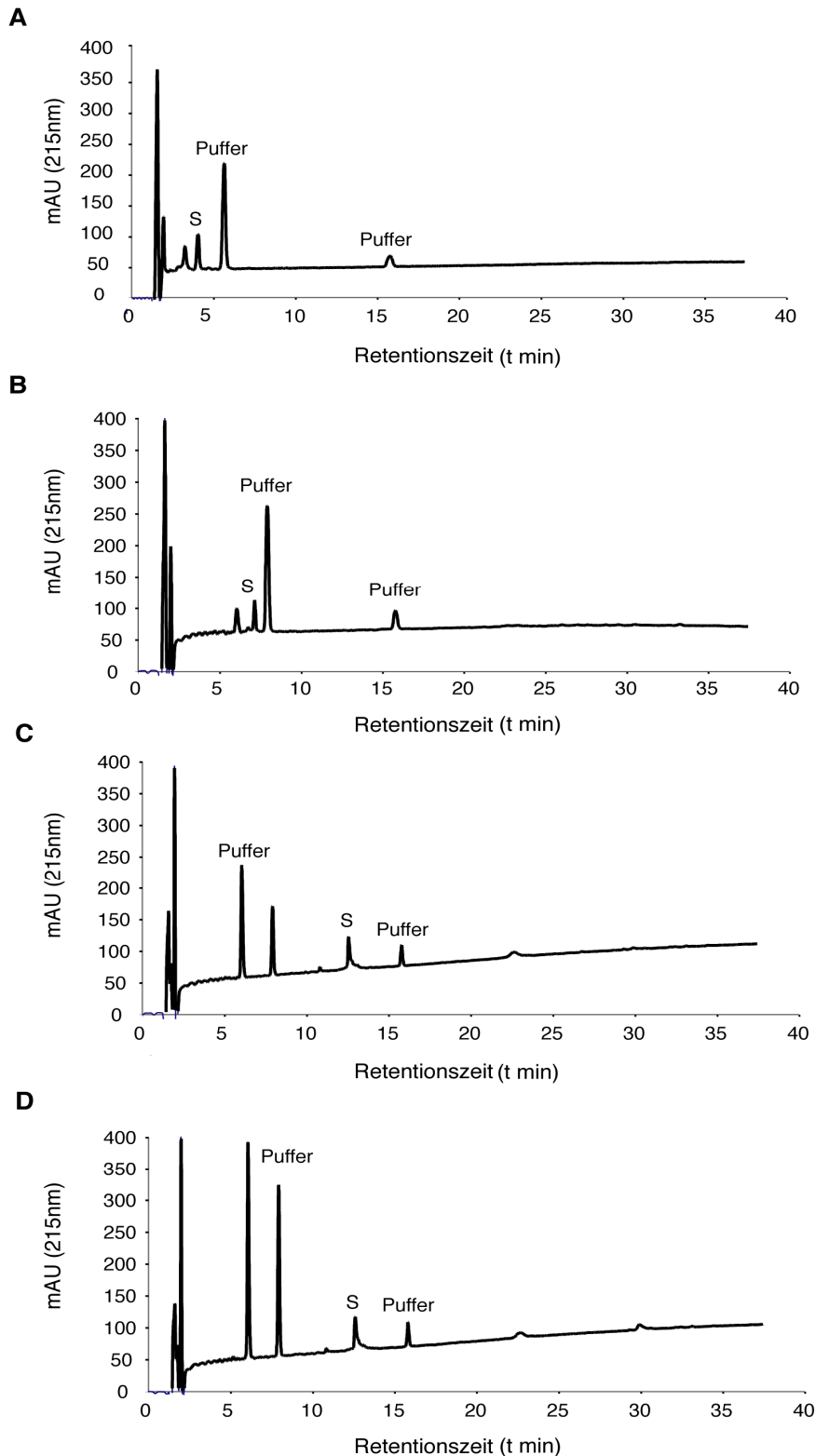


Abbildung 32: HPLC-Chromatogramme zur Spaltungsanalyse der Peptide p20/VPg und $3CL^{pro}/3DL^{pol}$ durch das Fusionsprotein $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$

(A) Kontrollanalyse des Peptids p20/VPg; (B) Auftrennung des Spaltungsansatzes p20/VPg+ $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$; (C) Kontrollanalyse des Peptids $3CL^{pro}/3DL^{pol}$; (D) Auftrennung des Spaltungsansatzes $3CL^{pro}/3DL^{pol}$ + $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$. Alle Ansätze wurden durch reversed-phase Chromatographie (YMC-Pack ODS-AQ column, YMC Europe) mit Hilfe der HPLC (Äkta purifier, AMERSHAM BIOSCIENCES) analysiert. Die Elution der Peptide wurde durch eine Absorptionsmessung bei 215 nm erfasst. Der Bereich der maximalen Absorption bei 215 nm wurde integriert (mAU) und gegen die Retentionszeit (t min) in einem Chromatogramm dargestellt (Software: Unicorn 2.10). Die Substratpeaks wurden mit S gekennzeichnet.

Interessanterweise konnten dagegen im Rahmen der Analyse des *in trans*-Spaltungsassays, bei dem das Peptid VPg/3CL^{pro} gemeinsam mit 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} inkubiert wurde, zwei Spaltprodukte, P1 und P2, mit Hilfe der *reversed phase* Chromatographie, detektiert werden (Abb. 33).

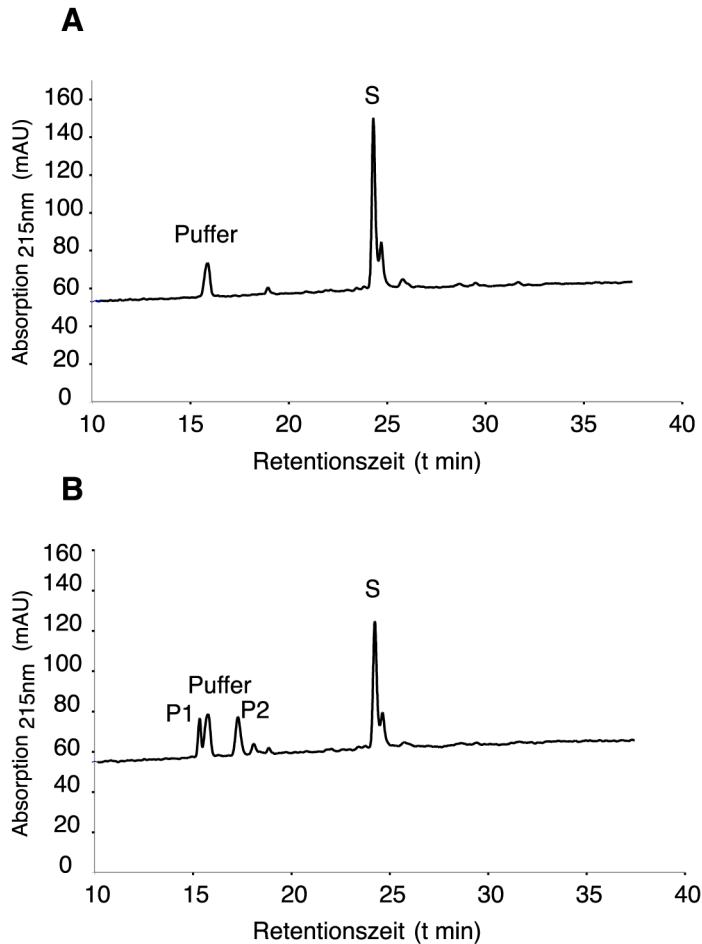


Abbildung 33: HPLC-Chromatogramme zur Untersuchung der Spaltung des Peptids VPg/3CL^{pro} durch das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol}

Das Peptid allein als auch der *trans*-Spaltungsansatz wurde durch *reversed-phase* Chromatographie (YMCPack ODS-AQ column, YMC Europe) mit Hilfe der HPLC (Äkta purifier, AMERSHAM BIOSCIENCES) analysiert. Die Elution der Peptide wurde durch eine Absorptionsmessung bei 215 nm erfasst. Der Bereich der maximalen Absorption bei 215 nm wurde integriert (mAU) und gegen die Retentionszeit (t min) in einem Chromatogramm dargestellt (Software: Unicorn 2.10). Der Substratpeak wurde durch S gekennzeichnet. Die Spaltprodukte wurden mit P1 und P2 markiert. (A) VPg/3CL^{pro} (B) VPg/3CL^{pro} + 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol}

Anhand der massenspektrometrischen Analyse der Spaltprodukte des Peptids VPg/3CL^{pro} konnte für das Spaltprodukt P1 ein Molekulargewicht von 1029.489 Da berechnet werden. Dieses Molekulargewicht entsprach dem des Peptids YNEKLSFE (siehe Abb. 34 A). Für das Spaltprodukt P2 wurde ein Molekulargewicht von 757.388 Da bestimmt, das dem des Peptids APPSIWS zugeordnet werden konnte (siehe Abb. 34 B). Diese Daten bestätigen, dass eine Spaltung des Peptids VPg/3CL^{pro} an dem Aminosäuremotiv E/A stattgefunden hatte.

Offensichtlich ist demnach das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} notwendig, um das Spaltmotiv E/A zwischen den Proteinen VPg und 3CL^{pro} prozessieren zu können. Die 3CL^{pro} allein war nicht in der Lage, das Spaltmotiv E/A in *trans* zu spalten (siehe 3.2.33 Abb. 29 D).

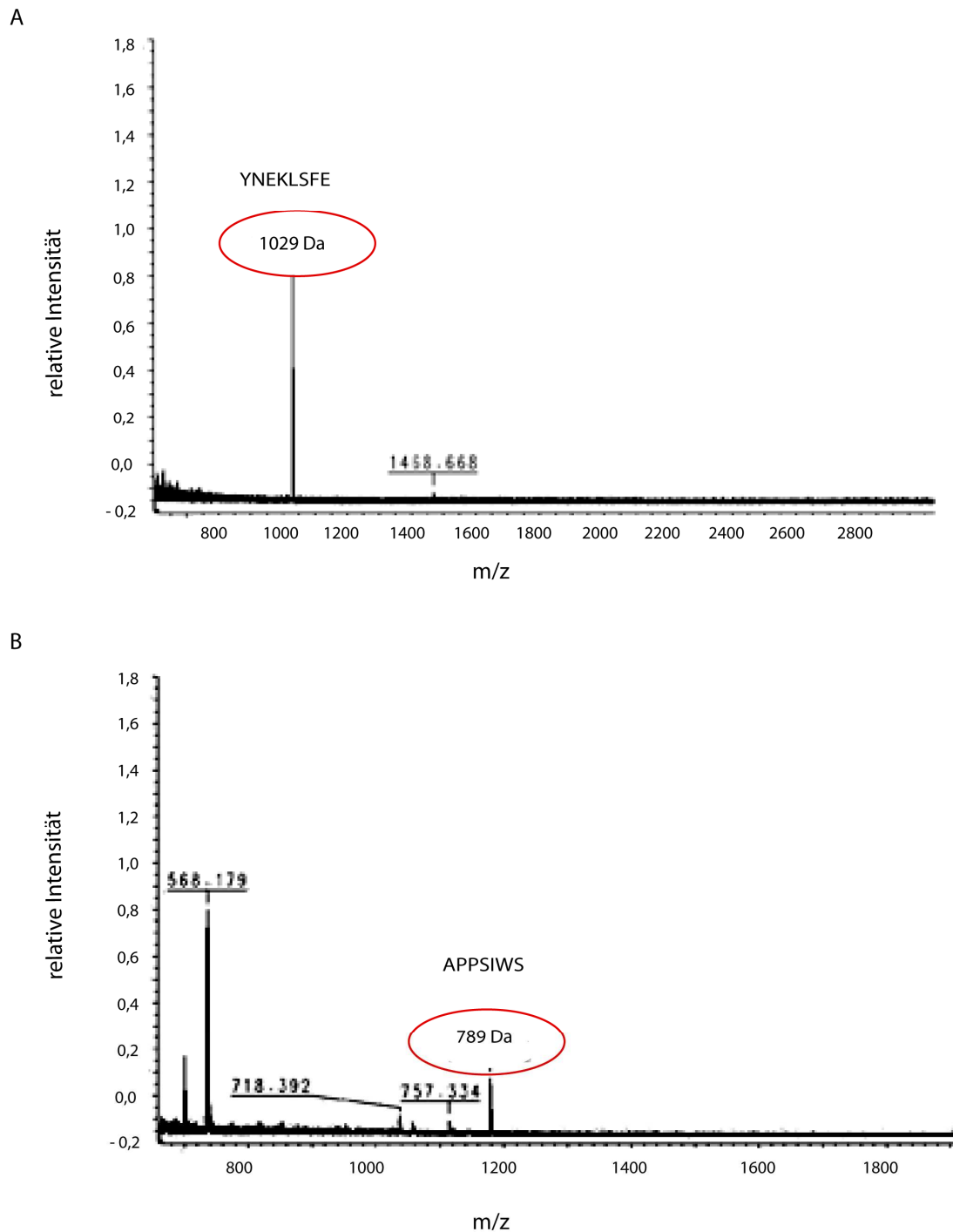


Abbildung 34: Massenspektrometrische Analyse der Spaltprodukte des Peptids VPg/3CL^{pro}
Die Spaltprodukte P1 und P2 des Peptids VPg/3CL^{pro} wurden im Rahmen der HPLC-Analyse fraktioniert und durch Maldi-MS Analyse, unter Verwendung des Massenspektrometers (QSTAR Pulsar I, MDS Sciex, Concord, Canada), analysiert (siehe 2.2.10.8.2). Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software BioAnalyst QS v.1 (MDS Sciex, Concord, Canada).
(A) MS-Spektrum des Spaltproduktes P1 (B) MS-Spektrum des Spaltproduktes P2

3.2.3.7 Die Peptide p37/2C^{NTPase}, 2C^{NTPase}/p20 und VPg/3CL^{pro} wurden von 3CL^{pro} und 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} mit unterschiedlichen Effizienzen prozessiert

Zur Charakterisierung der Substratspezifitäten von 3CL^{pro} und 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} wurden die Enzyme in Standard *in trans*-Spaltungsassays mit den Peptiden p37/2C^{NTPase}, 2C^{NTPase}/p20 und VPg/3CL^{pro} inkubiert (siehe 2.2.10.3). Zur Berechnung der Spalteffizienzen (F) wurde jeder Spaltungsansatz mit Hilfe der *reversed phase* Chromatographie analysiert. Anschließend wurden die Werte der maximalen Absorption bei 280 nm (mAU) der Spaltprodukte durch die mAU-Werte der Substrate dividiert (siehe 2.2.10.5). Von vier unabhängig voneinander durchgeführten *in trans*-Spaltungsassays der einzelnen Peptide wurden die Mittelwerte der Spalteffizienzen (F) ermittelt. Anhand einer nicht-parametrischen Berechnung, unter Verwendung des Mann-Whitney *U* Tests (siehe 2.2.10.6), erfolgte die statistische Auswertung der Versuche (Abb. 35 A). Beim Vergleich der Spalteffizienzen (F) wurde deutlich, dass die Spezifität von 3CL^{pro} an den Peptiden p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20 signifikant höher war als die Spaltspezifität von 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} an diesen Peptiden. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass die Spaltmotive zwischen dem Protein p37 und der 2C^{NTPase} und zwischen der 2C^{NTPase} und dem Protein p20 mit höherer Effizienz von der 3CL^{pro} prozessiert wurden. Die Prozessierung des Spaltmotivs VPg/3CL^{pro} konnte nur von dem Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} katalysiert werden.

Anhand der Berechnungen der relativen Spalteffizienzen von 3CL^{pro} und dem Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} sollten vergleichende Aussagen darüber ermöglicht werden, zu welchem der Peptide die Enzyme eine höhere Substratspezifität aufwiesen. Dafür wurde das Peptid 2C^{NTPase}/p20 als Kompetitionspeptid gemeinsam mit einem zweiten Peptid im *trans*-Spaltungsassay koinkubiert (siehe 2.2.10.4).

Bei der Koinkubation des Peptids 2C^{NTPase}/p20 mit dem Peptid p37/2C^{NTPase} konnte eine relative Spalteffizienz der 3CL^{pro} am Peptid p37/2C^{NTPase} berechnet werden, die wesentlich geringer ist als am Peptid 2C^{NTPase}/p20 (Abb. 35 B). Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass die 3CL^{pro} eine höhere Substratspezifität zum Peptid 2C^{NTPase}/p20 als zu dem Peptid p37/2C^{NTPase} aufwies. Beim Vergleich der relativen Spaltspezifitäten des Fusionsproteins 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} konnte nachgewiesen werden, dass das Peptid VPg/3CL^{pro} wesentlich effizienter gespalten wurde als das Peptid p37/2C^{NTPase}, wenn diese Peptide mit dem Peptid 2C^{NTPase}/p20 koinkubiert wurden. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} eindeutig eine höhere Spezifität zu dem Peptid VPg/3CL^{pro} als zu den Peptiden 2C^{NTPase}/p20 und p37/2C^{NTPase} aufwies.

Die Berechnungen zu den Spaltspezifitäten und den relativen Spalteffizienzen wiesen auf eine differentielle Spaltung des Polyproteins durch $3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ hin.

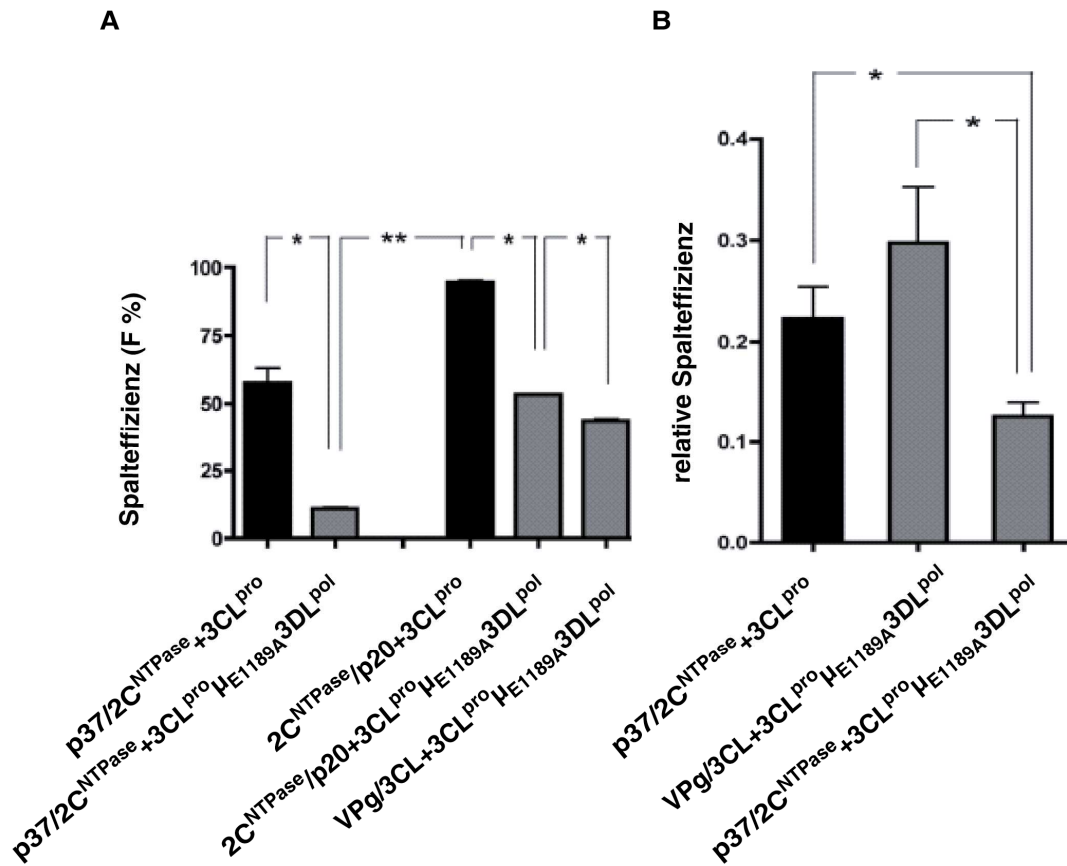


Abbildung 35: Differentielle trans Spaltung der Peptide p37/2C^{NTPase}, 2C^{NTPase}/p20 und VPg/3CL^{pro} durch 3CL^{pro} und 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol}

(A) Zur Bestimmung der Spalteffizienzen (F, %) wurden trans-Spaltungsassays (2.2.10.3) durchgeführt, in denen die Peptide p37/2C^{NTPase}, 2C^{NTPase}/p20 und VPg/3CL^{pro} jeweils mit der 3CL^{pro} bzw. dem Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} inkubiert wurden.

Die Bestimmung der Spalteffizienzen (F, %) erfolgte durch die Berechnung des Quotienten aus mAU Produkt/mAU Substrat. In dem Diagramm sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt.

(B) Die Berechnung der relativen Spalteffizienzen beruhte auf Konkurrenzexperimenten in denen das Konkurrenzpeptid 2C^{NTPase}/p20 mit equimolaren Konzentrationen der Peptide p37/2C^{NTPase} bzw. VPg/3CL^{pro} und dem jeweiligen Enzym (3CL^{pro} oder 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol}) koinkubiert wurden. Die Berechnung der relativen Spalteffizienzen erfolgte nach folgender Formel:

$(V_{max}/K_m)_P / (V_{max}/K_m)_{PK} = \log(1 - F_P) / \log(1 - F_{PK})$, wobei P das zu untersuchende Peptid darstellte und PK das Konkurrenzpeptid.

Für statistische Vergleichstudien wurde der Mann-Whitney U Test durchgeführt. Der Signifikanzgrad wurde durch * ($p < 0,015$) und ** ($p < 0,001$) dargestellt.

3.2.4 Untersuchungen zur Prozessierung des Vorläuferproteins p20VPg im eukaryotischen Zellsystem

In den vorangegangenen Versuchen zur Charakterisierung der Polyproteinprozessierung konnte das Spaltmotiv zwischen dem Protein p20 und VPg weder durch die 3CL^{pro} (siehe 3.2.3.3 Abb. 29 A, B) noch durch 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} (siehe 3.2.3.6 Abb. 32 A, B) prozessiert wurden. Möglicherweise ist die Prozessierung zwischen dem Vorläuferprotein p20VPg von einer Wechselwirkung zwischen zellulären Faktoren und der 3CL^{pro} abhängig.

Um dies zu untersuchen, wurden das Vorläuferprotein p20VPg und das 3CL^{pro} Vorläuferprotein ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} im eukaryotischen Zellsystem gemeinsam exprimiert. Dafür wurde zunächst die kodierende Sequenz für p20VPg C-terminal *in frame* mit dem 6xHis Tag fusioniert und anschließend in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES inseriert. Mit dem resultierenden Plasmid pUS-NORIIp20VPgIRES wurden 293T Zellen transfiziert. Nach 48-stündiger Proliferationszeit wurde das Zelllysate geerntet (siehe 2.2.7.6) und im SDS-Gel separiert. Mit Hilfe des Immunoblots, unter Verwendung des anti-pentaHis Antikörpers, konnte nur die Bande des 40 kDa großen Vorläuferproteins p20VPg nachgewiesen werden (Abb. 36 A, Spur 1). Anhand dieses Ergebnisses konnte ausgeschlossen werden, dass für die Spaltung des p20VPg Vorläuferproteins zelluläre Proteasen verantwortlich sind. In einem zweiten Ansatz wurden 293T Zellen gleichzeitig mit pUS-NORIIp20VPgIRES und mit dem Plasmid pUSNORII-ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} IRES, das für das Vorläuferprotein ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} kodierte, transfiziert. Die Analyse dieser Zelllysate mit Hilfe des Immunoblots, unter Verwendung des anti-pentaHis Antikörpers, zeigte ebenfalls nur das unprozessierte 40 kDa große p20VPg Vorläuferprotein (Abb. 36 A, Spur 2). Auch die Koexpression von p20VPg mit dem 3CL^{pro} Vorläuferprotein führte nicht zur Spaltung von p20VPg. Die niedermolekulare Bande, die in Abb. 36 A auf Spur 2 durch den anti-pentaHis Antikörper detektiert wurde, stellt das unprozessierte 37 kDa große ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} Vorläuferprotein dar. Unter Verwendung des anti-3CL^{pro} Serums konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem 37 kDa Protein um ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} handelte (Abb. 36 B, Spur 2). In einem Kontrollansatz wurden 293T-Zellen nur mit pUSNORII-ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} IRES transfiziert. Bei der Analyse dieser Zelllysate konnte im Immunoblot sowohl mit dem anti-pentaHis Antikörper (Abb. 36 A, Spur 3) als auch mit dem anti-3CL^{pro} Serum (Abb. 36 B, Spur 3) das 37 kDa große Vorläuferprotein ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} nachgewiesen werden.

Mit dem anti-3CL^{pro} Serum konnte zusätzlich in Spur 3 ein Protein mit niedrigerem Molekulargewicht detektiert werden. Dabei handelte es sich um die aus dem Vorläuferprotein Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} freigesetzte 19 kDa große 3CL^{pro}. Interessanterweise konnte in Abb. 36 B in Spur 2, in der die Zelllysate der Koexpression von p20VPg und Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} aufgetrennt wurden, im Immunoblot mit dem anti-3CL^{pro} Serum, das 19 kDa große 3CL^{pro} Spaltprodukt nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das Vorläuferprotein nicht prozessiert wurde. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass die Aktivität der 3CL^{pro} durch das Vorläuferprotein p20VPg reguliert wird.

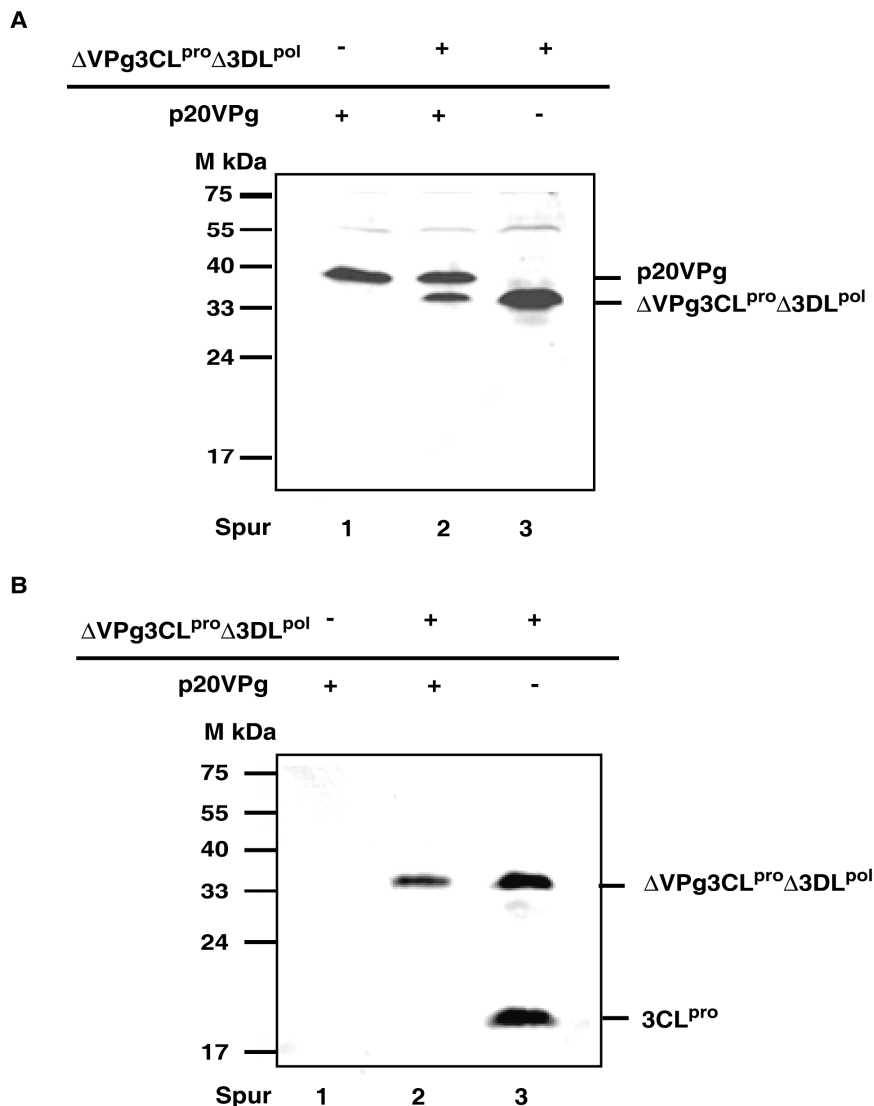


Abbildung 36: Koexpression von p20VPg und Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} in 293T Zellen

293T Zellen wurden unter Verwendung von Polyfect[®] Transfection Reagent (QIAGEN) mit 8 μ g des Plasmids pUS-NORIIp20VPgIRES (Spur 1) transfiziert. Ein zweiter Ansatz wurde mit je 4 μ g pUS-NORIIp20VPgIRES und pUSNORII- Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol}IRES kotransfiziert (Spur 2). In dem Kontrollansatz wurden die 293-T Zellen mit 8 μ g pUSNORII- Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol}IRES transfiziert (Spur 3). Nach 48-stündiger Proliferationszeit wurden die Zelllysate geerntet (siehe 2.2.9.6), im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend immunologisch mit Hilfe des Western Blot charakterisiert: (A) anti-pentaHis Antikörper (1:5000); (B) polyklonales anti-3CL^{pro} Serum (1:8000)

3.2.5 Spaltung des vom *ORF1* kodierten Polyproteins in Abhängigkeit der 3CL^{pro} im zellfreien System

Die spezifische *trans*-Spaltungsaktivität der 3CL^{pro} an dem Spaltmotiv Q/G sollte nun anhand des gesamten ORF1 Polyproteins verifiziert werden. Dafür wurde zunächst der komplette *ORF1* in den Vektor pET28b kloniert und somit das Plasmid pUS-NORII-ORF1ET28b generiert. Anschließend wurde mit Hilfe der *site-directed mutagenesis* (siehe 2.2.6) im aktiven Zentrum der 3CL^{pro} der konservierte Cysteinrest gegen einen Alaninrest ausgetauscht, was zur Inaktivierung der 3CL^{pro} führen sollte. Das so mutierte Plasmid wurde als pUS-NORII-ORF1 μ_{C139A} ET28b bezeichnet. Die Untersuchung zur *trans* Spaltaktivität der 3CL^{pro} sollte mit Hilfe eines *in vitro* Translationsassays, der mit einem Transkriptionsschritt gekoppelt war (PROTEINSCRIPT™ T7, AMBION), durchgeführt werden. Sowohl pUS-NORII-ORF1ET28b als auch pUS-NORII-ORF1 μ_{C139A} ET28b wurden *in vitro* transkribiert. Die Translationen des wt-Polyproteins und des mutierten Polyproteins wurden in *in vitro* Standardansätzen durchgeführt (siehe 2.2.10.2). Zur Untersuchung der *trans*-Spaltaktivität der 3CL^{pro} wurde ein zweiter paralleler Translationsansatz unter Koinkubation mit der zuvor aufgereinigten 3CL^{pro} durchgeführt. Allen Translationsansätzen wurde [³⁵S]-Methionin zugesetzt, so dass die Translationsprodukte mit Hilfe der Autoradiographie analysiert werden konnten. Im Standardansatz, in dem das Polyprotein ohne Koinkubation mit der 3CL^{pro} translatiert wurde, konnten drei Produkte detektiert werden (Abb. 37, Spur 2), was darauf hinweist, dass eine Prozessierung des Polyproteins stattgefunden hat. Das hochmolekulare Produkt entsprach dem 113 kDa Vorläuferprotein p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol}. Die beiden niedermolekularen Produkte im Autoradiogramm stellten die 41 kDa große 2C^{NTPase} sowie das 37 kDa große N-terminale Protein p37 dar. Die Zugabe der 3CL^{pro} zum Translationsansatz des wt-Polyproteins führte zu dem gleichen Ergebnis (Abb. 37, Spur 3). Dieses Ergebnis verwies darauf, dass die gereinigte 3CL^{pro} eine identische Spaltaktivität am Polyprotein entwickelte, wie das aus dem Polyprotein freigesetzte 3CL^{pro}-Fragment. Das mutierte Polyprotein, das ein inaktives katalytisches Zentrum der 3CL^{pro} aufwies, wurde als komplettes 180 kDa großes Vorläuferprotein translatiert (Abb. 37, Spur 4). Eine kotranslationale Spaltung des Polyproteins konnte aufgrund der Inaktivierung des katalytischen Zentrums der 3CL^{pro} nicht erfolgen. Wurde dem Translationsansatz des mutierten Polyproteins die 3CL^{pro} zugesetzt, konnten im Autoradiogramm zwei Spaltprodukte des Polyproteins detektiert werden. Dabei handelte es sich bei dem höhermolekularen Protein um das 113 kDa große Vorläuferprotein p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol}.

Das niedermolekulare Spaltprodukt (Abb. 37, Spur 5) stellte vermutlich das unprozessierte, 78 kDa große, Vorläuferprotein $p372C^{NTPase}$ dar. Spaltprodukte des $p372C^{NTPase}$ Vorläuferproteins konnten ebenfalls sehr schwach detektiert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass auch das komplette Polyprotein *in trans* von der $3CL^{pro}$ gespalten werden konnte. Indem gezeigt wurde, dass zunächst das Spaltmotiv zwischen der $2C^{NTPase}$ und dem Protein p20 prozessiert wurde, was in der Freisetzung der Vorläuferproteine $p372C^{NTPase}$ und $p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol}$ resultierte, konnte ein Beleg für eine regulierte Prozessierung des Polyproteins erbracht werden.

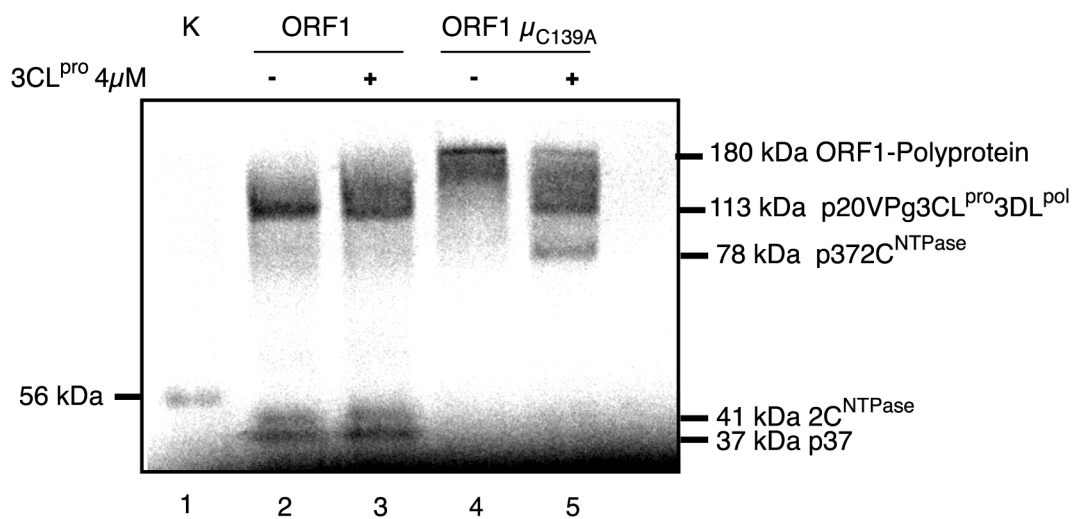


Abbildung 37: Prozessierung des ORF 1 Polyproteins in Abhängigkeit der $3CL^{pro}$ -Aktivität

Die Translation des wt-ORF1 als auch des mutierten $ORF1_{\mu C139A}$ erfolgte mit Hilfe des PROTEINSCRIPT™ T7 KIT (AMBION) unter Verwendung von $[^{35}S]$ -Methionin (siehe 2.2.10.2) Parallel zum Standardansatz wurde jeweils das wt-Polyprotein und das mutierte Polyprotein mit $4 \mu M$ der aufgereinigten $3CL^{pro}$ koinkubiert. Die Translationsansätze wurden in einem 12 % igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. **Spur 1:** Als Größenvergleich wurde das *in vitro* translatierte 56 kDa große Protein X-ref als Positivkontrolle (K) mitgeführt.

Spur 2: WT-ORF1; **Spur 3:** WT-ORF1 + $1 \mu M$ $3CL^{pro}$; **Spur 4:** $ORF1_{\mu C139A}$; **Spur 5:** $ORF1_{\mu C139A}$ + $1 \mu M$ $3CL^{pro}$

3.2.6 Expression des NV-cDNA-Genoms in 293T Zellen

Nach der Untersuchung der kotranslationalen Spaltung des vom *ORF1* kodierten Polyproteins im zellfreien System (siehe 3.2.5) sollte die Expression und Prozessierung des kompletten NV-GGII/4/Dresden/1997/GE Volle-Länge Genoms im humanen Zellsystem analysiert werden. Für diesen Zweck wurde das Plasmid pUSNORII-VLIREs in die humane Nierenendothelzelllinie 293T transfiziert. Die Expression der im *ORF1* kodierten viralen Proteine wurde mit Hilfe des Immunoblots, unter Verwendung polyklonaler anti-3CL^{pro} und Anti-3DL^{pol} Seren untersucht (siehe 2.1.6). Die Translation des im *ORF1* kodierten Vorläuferpolyproteins konnte mit keinem dieser Seren im Immunoblot nachgewiesen werden (siehe Anhang 2). Auch putative Spaltprodukte, die infolge einer kotranslationalen Prozessierung des Polyproteins freigesetzt wurden, konnten mit Hilfe der anti-3CL^{pro}- und anti-3DL^{pol}-Seren nicht detektiert werden (siehe Anhang 2, A+B). Das durch den *ORF2* kodierte strukturelle Kapsidprotein sollte mit Hilfe eines polyklonalen anti-Kapsid Serums (siehe 2.1.6) nachgewiesen werden. Die Expression des *ORF2* konnte mit diesem Serum nicht nachgewiesen werden (siehe Anhang 2 C). Die Voraussetzung für die Transkription und die Translation des *ORF2* ist die Freisetzung funktionaler nicht-struktureller Proteine, die mit dem Schlüsselenzym der 3DL^{pol} einen Replikationskomplex bilden. Der Replikationskomplex ermöglicht die Synthese der subgenomischen RNA und somit die Translation des vom *ORF2* kodierten Kapsidproteins (siehe 1.5). Der Nachweis des Kapsidproteins wäre somit ein erster Hinweis auf das Vorliegen eines funktionellen Replikons. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien konnte nachgewiesen werden, dass von dem vorliegenden cDNA-Volle-Länge Klon keine virusspezifischen funktionalen Proteine exprimiert wurden.

3.2.7 Regulation der 3CL^{pro} Aktivität durch das Vorläuferprotein p20VPg

3.2.7.1 Aufreinigung des Vorläuferproteins p20VPg

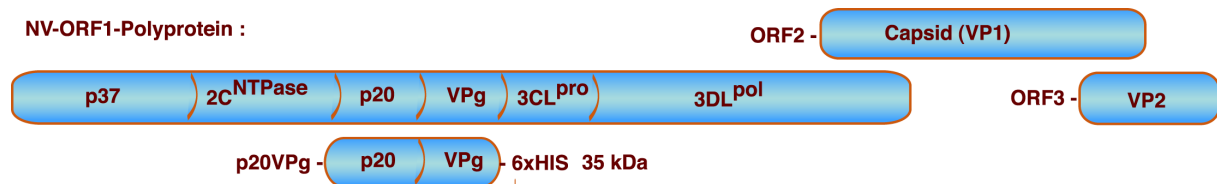


Abbildung 38: Schematische Darstellung des ORF1 Vorläuferproteins p20VPg im Vergleich zum NV-ORF1 Polyprotein

In einem vorangegangenen Experiment (siehe 3.2.4.) konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von p20VPg mit dem Vorläuferprotein Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} die Freisetzung der 3CL^{pro} verhindert (Abb. 36 B). In diesem Versuch sollte nun untersucht werden, ob p20VPg die proteolytische Aktivität der 3CL^{pro} *in trans* inhibieren kann.

Für die Untersuchung des Einflusses des Vorläuferproteins p20VPg (Abb. 38) auf die Aktivität der 3CL^{pro} musste das Vorläuferprotein p20VPg zunächst exprimiert und aufgereinigt werden. Dafür wurde die kodierende Sequenz für das Vorläuferprotein p20VPg in den bakteriellen Expressionsvektor pET28b kloniert und C-terminal *in frame* mit dem 6xHis Tag fusioniert. Das somit generierte Plasmid pUS-NORIIp20VPgET28 wurde in *E.coli* BL21DE3 Zellen transformiert und p20VPg heterolog exprimiert. Die Aufreinigung der Zelllysate erfolgte durch eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie, die mit Hilfe der FPLC durchgeführt wurde. Nach der Auftrennung wurden die Eluate fraktioniert gesammelt und im SDS-Gel aufgetrennt. In den Fraktionen 14 und 15 konnte das 36 kDa große p20VPg Vorläuferprotein durch Coomassiefärbung detektiert werden (Abb. 39).

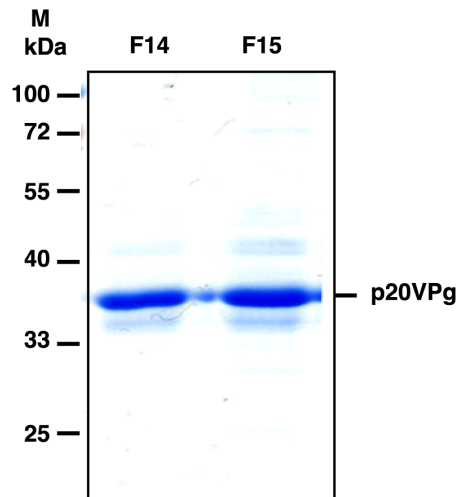


Abbildung 39: Aufreinigung des Vorläuferproteins p20VPg

Nach der heterologen Expression des NV-Vorläuferproteins p20VPg in *E.coli* wurde das Proteinlysate geerntet (siehe 2.2.8.1, 2.2.8.2). Nach einer i. N.-Dialyse (siehe 2.2.8.5) des Lysates wurde das Proteingemisch aufgereinigt. Die Aufreinigung des Zelllysates erfolgte mit Hilfe der Ni^{2+} -Affiniätschromatographie unter Verwendung der FPLC (HisTrapTM FF crud; GE HEALTHCARE). Die an die Säule gebundenen Proteine wurden durch einen Imidazolgradienten eluiert und fraktioniert gesammelt. Parallel dazu erfolgte eine Absorptionsmessung bei 280 nm. Fraktionen, in denen Proteine detektiert wurden, wurden in der SDS-Page aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert.

3.2.7.2 Das Vorläuferprotein p20VPg reguliert die Aktivität von 3CL^{pro}

Für die Untersuchungen zur Regulation der 3CL^{pro} Aktivität durch das Vorläuferprotein p20VPg wurde der *in vitro trans* Spaltungstest (siehe 2.2.10.3) durchgeführt. Dafür wurden die Peptide p37/2C^{NTPase} bzw. 2C^{NTPase}/p20 mit 4 μM der 3CL^{pro} und zusätzlich mit 1 μM des p20VPg Vorläuferproteins in dem Reaktionsansatz gemischt. Die Inkubation erfolgte anschließend für 17 h bei 30 °C. Als Kontrollversuch wurde parallel die Spaltung der beiden Peptide durch die 3CL^{pro} analysiert. Die Auswertung der *trans* Spaltungsassays erfolgte mit Hilfe der *reversed-phase* Chromatographie (siehe 2.2.10.8.1) und anschließender Berechnung der Spalteffizienzen (F) (siehe 2.2.10.5). Die Spalteffizienz (F) der 3CL^{pro} am Peptid p37/2C^{NTPase} betrug 0,43 (Abb. 40). In den Ansätzen, in denen 3CL^{pro} mit dem Vorläuferprotein p20VPg kokubiert wurde, verringerte sich die Spalteffizienz an diesem Peptid auf 0,22 (Abb. 40) und ist somit signifikant geringer (*) als im 3CL^{pro}-Kontrollspaltungsassay. Für die Spaltung des Peptids 2C^{NTPase}/p20 durch 3CL^{pro} wurde eine Effizienz von 0,88 berechnet (Abb.40).

Durch die Zugabe des Vorläuferproteins p20VPg zum Reaktionsansatz wurde die Spalteffizienz auf 0,72 reduziert (Abb. 40).

Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Vorläuferprotein p20VPg einen Einfluss auf die Aktivität der 3CL^{pro} hat. Möglicherweise nimmt es dabei eine regulierende Funktion bei der Prozessierung des *ORF1* Polyproteins ein.

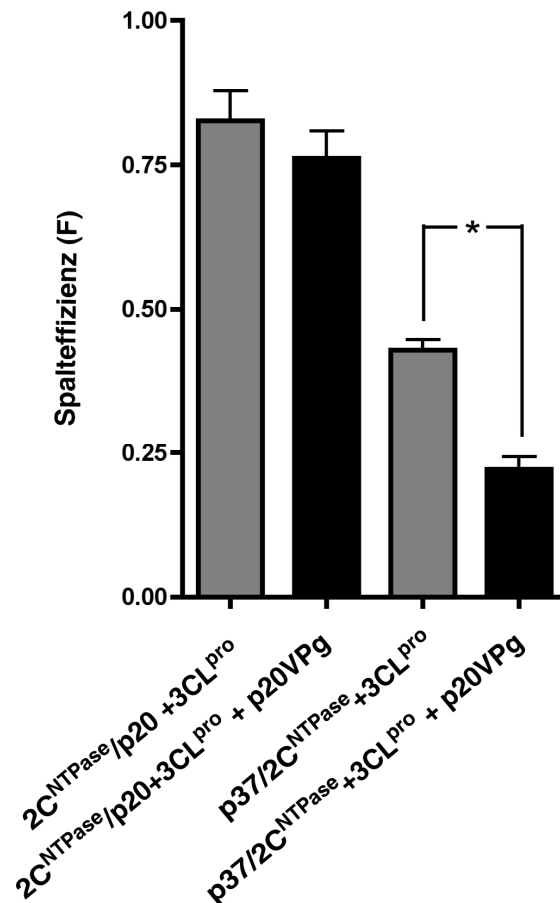


Abbildung 40: Regulierung der 3CL^{pro} Aktivität durch p20VPg

Zur Untersuchung der Inhibierung der 3CL^{pro} durch p20VPg wurden die Peptide p37/2C^{NTPase} bzw. 2C^{NTPase}/p20 mit der 3CL^{pro} und dem Vorläuferprotein p20VPg im trans-Spaltungsassay inkubiert (siehe 2.2.10.3). Als Kontrollansätze dienten Inkubationsansätze, in denen die Peptide nur mit der 3CL^{pro} inkubiert wurden. Die Analyse aller Ansätze erfolgte anschließend durch reversed-phase-Chromatographie (YMCPack ODS-AQ column, YMC Europe) mit Hilfe der HPLC (Äkta purifier, AMERSHAM BIOSCIENCES), wobei parallel zur Elution der Peptide eine Absorptionsmessung bei 215 nm erfolgte. Die Bereiche der maximalen Absorption (mAU) bei 215 nm wurden integriert und als mAU Wert angegeben. Für die Berechnung der Spalteffizienz (F) wurden die mAU Werte der Substrate durch die mAU Werte der Produkte dividiert (siehe 2.2.10.5). Alle Ansätze wurden vierfach durchgeführt und anschließend die Abweichung vom Mittelwert berechnet. Für statistische Vergleichstudien wurde der Mann-Whitney U Test durchgeführt. Der Signifikanzgrad wurde durch ein Sternchen (*) dargestellt und betrug $p=0.0143$.

3.3 Inhibierung der 3CL^{pro}

Der initiale Schritt der NV-Replikation basiert auf der Aktivität der viruseigenen Protease 3CL^{pro}. Eine Inaktivierung dieses Enzyms würde die proteolytische Spaltung des *ORF1* kodierten Polyproteins verhindern und somit auch die Replikation des viralen Genoms. Das 3CL^{pro} Enzym stellt demnach ein geeignetes Zielmolekül für antivirale Substanzen als Therapeutikum gegen Norovirusinfektionen dar.

In dieser Arbeit wurden sechs verschiedene Substanzen auf ihre Wirkung als 3CL^{pro} Inhibitor getestet. Bei den zu untersuchenden Substanzen handelte es sich zum Einen um α -MAPI (*anti-microbial alkaline protease inhibitor*), ein Peptidaldehyd, das die Aktivität der HIV-Protease sehr effizient hemmt (Sarubbi *et al.*, 1993). Zum anderen wurde die Substanz CMK-Inhibitor (*Chloromethyl ketone inhibitor*) getestet. Diese inaktiviert als Peptidanaloga (Cbz–Val–Asn–Ser–Thr–Leu–Gln–CMK) die Coronavirus Protease M^{pro} (Anand *et al.*, 2003). Des Weiteren wurden die Substanzen XP-10, XP-17, XP-40 und XP-41 (siehe 2.1.11) als potentielle NV-3CL^{pro} Inhibitoren getestet, die vom Institut für Biochemie der Universität Lübeck zur Verfügung gestellt wurden.

Für die Inhibierungstests wurden 60 μ M des Peptid p37/2C^{NTPase} mit jeweils 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M; 640 μ M und 800 μ M der zu testenden Substanz und 4 μ M der 3CL^{pro} unter Verwendung des *trans*-Spaltungstests bei 30 °C für 17 h inkubiert (siehe 2.2.10.3). Als Kontrolle wurde das Peptid p37/2C^{NTPase} mit 4 μ M der 3CL^{pro} inkubiert. Die Spaltungen wurden durch die *reversed-phase*-Chromatographie analysiert (siehe 2.2.10.8.1) und anschließend die Spalteffizienzen (F) berechnet (siehe 2.2.10.5). Die Bestimmung der relativen Spalteffizienz (V_{max}/K_m) erfolgte durch folgende Formel: $(v_{max}/k_m)_{3C}/(v_{max}/k_m)_{3C+I} = \log(1-F_{3C})/\log(1-F_{3C+I})$, wobei 3C den Spaltansatz ohne Inhibitor darstellte und 3C+I den Spaltansatz mit dem jeweiligen Inhibitor kennzeichnete. Die berechneten Werte wurden gegen die verwendete Konzentration der zu untersuchenden Substanz in einem Diagramm dargestellt (Abb. 41 A). Die Werte der relativen Spalteffizienzen (%) ermöglichten, unter Verwendung der Funktion zur Berechnung des Anstieges ($f(x)=-mx+b$), die Berechnung der Substanzkonzentration, die die Aktivität der 3CL^{pro} um 50 % inhibiert. Dieser Wert wurde als IC₅₀ (*inhibitory concentration*) bezeichnet (Abb. 41 B). Für die Substanz CMK-Inhibitor konnte somit ein IC₅₀-Wert von 85 μ M bestimmt werden. Der IC₅₀-Wert von α -MAPI betrug 294 μ M. Für die Substanz XP-10 wurde ein IC₅₀-Wert von 484 μ M, für XP-17 ein IC₅₀-Wert von 146 μ M, für XP-40 ein IC₅₀-Wert

von 192 μM und für XP-41 ein IC_{50} -Wert von 120,5 μM berechnet. Mit einem IC_{50} -Wert von 85 μM weist die Substanz CMK den geringsten IC_{50} -Wert auf.

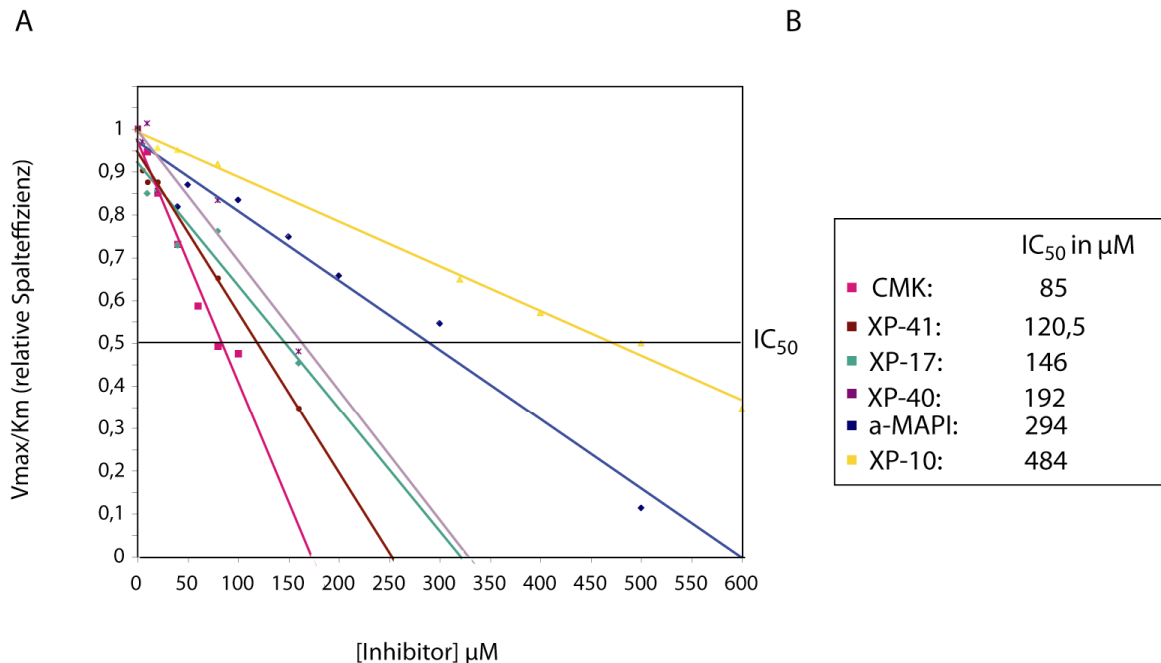


Abbildung 41: Bestimmung des IC_{50} -Wertes verschiedener potentieller antiviraler Substanzen

Die Substanzen XP-10, XP-17, XP-40, XP-41, a-MAPI und CMK-Inhibitor wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit der 3CL^{pro} und dem Peptid $\text{p37/2C}^{\text{NTPase}}$ im trans-Spaltungsassay inkubiert (siehe 2.2.10.3). Die Auswertung der Inhibierungsansätze erfolgte mit Hilfe der reversed phase-Chromatographie. Die Bereiche der maximalen Absorption bei 215 nm wurden integriert und als mAU Wert angegeben. Die mAU-Werte der jeweiligen Inhibierungsansätze wurden für die Berechnung der Spalteffizienzen (F) verwendet. Zur Berechnung der IC_{50} -Werte wurden die relativen Spalteffizienzen der jeweiligen Inhibierungsversuche ins Verhältnis zu den relativen Spalteffizienzen der Spaltungsversuche mit der 3CL^{pro} ohne Inhibitor gesetzt. Diese Berechnung erfolgte nach folgender Formel: $(v_{\text{max}}/k_m)_{3\text{C}}/(v_{\text{max}}/k_m)_{3\text{C}+I} = \log(1-F_{3\text{C}})/\log(1-F_{3\text{C}+I})$ (siehe 2.2.12.5).

(A) Die berechneten relativen Spalteffizienzen wurden gegen die getestete Konzentration des Inhibitors in einem Diagramm dargestellt. (B) Zur Berechnung der Konzentration bei der die relative Spalteffizienz 0,5 betrug, wurde die Funktion zur Berechnung Anstiegs verwendet: $f(X) = -mx + b$, wobei m den Anstieg darstellt und b die Verschiebung auf der Y-Achse bei $X=0$. Die berechneten Werte entsprachen den IC_{50} -Werten und wurden in der rechten Tabelle dargestellt.

4. Diskussion

Noroviren sind die häufigste Ursache akuter viraler Gastroenteritiden. In Deutschland treten jährlich durchschnittlich 80 durch NV verursachte Gastroenteritisfälle pro 100.000 Einwohner auf. Bei Kleinkindern und älteren Personen steigen die Krankheitsfälle sogar auf bis zu durchschnittlich 250 Fälle pro 100.000 Einwohner (Koch *et al.*, 2006). Da bereits geringste Virustiter (10-100 Virionen) für eine Neuinfektion ausreichen (Caul, 1996), ist die Wahrscheinlichkeit für den Ausbruch von Epidemien in geschlossenen Einrichtungen wie in Krankenhäusern, Altenheimen und Kindergärten besonders hoch. Antivirale Medikamente, die eine Norovirusvermehrung inhibieren, würden eine gute Möglichkeit bieten, Epidemieausbrüche zu verhindern bzw. einzudämmen. Voraussetzung dafür ist allerdings zunächst das genaue Verständnis der NV-Replikation sowie die Funktionsweise der einzelnen Komponenten, die in die NV-Replikation involviert sind.

Die meisten RNA-Viren mit einem kleinen, positiv orientierten einzelsträngigen Genom weisen eine ähnliche Translationsstrategie auf, wobei zunächst ein Polyprotein exprimiert wird, welches das Vorläuferprotein für die strukturellen- sowie nicht-strukturellen Proteine darstellt. Kotranslational wird dann das Polyprotein gespalten. Die Prozessierung erfolgt dabei entweder durch zelluläre Proteasen oder aber durch viruseigene Proteasen, wie z. B. bei den *Picornaviridae*, den *Caliciviridae* und den *Coronaviridae* (Hanecak *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1996; Ziebuhr *et al.*, 1995). Die Synthese viruseigener Proteasen hat für das Virus den Vorteil, dass die Prozessierung des Polyproteins unabhängig von Wirtszellproteasen stattfinden kann. Dadurch wird die virale Replikation nicht durch das Wirtszellsystem limitiert. Im Gegensatz zur Polyproteinprozessierung bei Poliovirus, die auf der Aktivität zweier unterschiedlicher viraler Proteasen (2A und 3CL^{pro}) beruht (Nicklin *et al.*, 1987), basiert die Prozessierung des CV-Polyproteins nach dem derzeitigen Kenntnisstand auf *cis*- und *trans*- Aktivitäten des Proteasefragmentes 3CL^{pro}. Aus vorangegangenen Studien ist bereits bekannt, dass die Norovirus Protease an definierten Spaltmotiven innerhalb des Polyproteins proteolytisch aktiv wird. Dabei handelt es sich um die Spaltmotive Glutamin/Glycin (Q/G) zwischen den NV-Proteinen p37 und 2C^{NTPase} sowie zwischen der NV-2C^{NTPase} und dem NV-Protein p20. Als weitere Spaltstellen wurden das Motiv Glutaminsäure/Glycin (E/G) zwischen dem Protein p20 und VPg, das Motiv Glutaminsäure/Alanin (E/A) zwischen den Proteinen VPg und 3CL^{pro} sowie das Motiv Glutaminsäure/Glycin (E/G) zwischen der 3CL^{pro} und der 3DL^{pol} beschrieben (Liu *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999).

4.1 Sequentielle Prozessierung des NV-Polypeptids

4.1.1 *cis*-Spaltung des Polypeptids

Die genaue Regulierung der kotranslationalen Spaltung des Polypeptids, die die sequentielle und differentielle Freisetzung von Vorläuferproteinen sowie den einzelnen strukturellen und nicht-strukturellen Proteinen ermöglicht, ist bisher nicht erforscht. Die erste Arbeitshypothese dieser Arbeit lautete folglich, dass die Prozessierung des Polypeptids von *in cis* und *in trans* Aktivitäten der NV-3CL^{pro} abhängig ist. Wie in Studien von Belliot *et al.* bereits gezeigt wurde, weist das NV-Vorläuferprotein 3CL^{pro}3DL^{pol} ebenfalls eine proteolytische Aktivität auf (Belliot *et al.*, 2003). Aus dieser Studie leitet sich die zweite Hypothese dieser Arbeit ab, die besagte, dass die Prozessierungsspezifität des Vorläuferproteins 3CL^{pro}3DL^{pol} sich von der von 3CL^{pro} unterscheiden könnte.

Für die Familie der *Caliciviridae* konnte mehrfach beschrieben werden, dass die Freisetzung der 3CL^{pro} aus dem vom *ORF1* kodierten Polypeptid auf der *cis*-Aktivität der 3CL^{pro} basiert (Sosnovtseva *et al.*, 1999; Wirblich *et al.*, 1995). Anhand der Generierung eines NV-Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$, das die komplette NV-3CL^{pro} Sequenz enthält, sollte verifiziert werden, dass die *cis*-Aktivität der 3CL^{pro} für die kotranslationale Spaltung des NV-Polypeptids verantwortlich ist. Voraussetzung für die Generierung von NV-Vorläuferproteinen war die Herstellung eines NV-Volle-Länge-cDNA Klons, der als Template für die Amplifikation der für die Vorläuferproteine kodierenden NV-cDNA diente.

Für die Generierung des NV-Volle-Länge-cDNA Klons wurden in einer vorherigen Arbeit (Herzog, 2004) zunächst aus Stuhlproben eines Patienten, der mit dem Norovirus infiziert war, die NV-RNA isoliert. Diese diente als Template für die Generierung von sechs Norovirus-spezifischen cDNA Fragmenten, die sich gegenseitig überlappten. Diese sechs Fragmente umfassten das komplette, aus drei offenen Leserahmen bestehende NV-Genom. In der hier vorgelegten Arbeit wurden diese sechs cDNA-Fragmente mit Hilfe der *overlap-extension* PCR fusioniert und hieraus das Volle-Länge NV-cDNA-Genom hergestellt. Dieses wurde anschließend in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES kloniert (siehe 3.1). Die *in frame* Insertion des NV-cDNA-Genoms wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Unter Verwendung des NV-Volle-Länge NV-cDNA-Genoms als Template wurde der cDNA Bereich amplifiziert, der für das NV-Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ kodierte.

In diesem Protein wurde die Sequenz der 3CL^{pro} N-terminal von den letzten vier Aminosäuren des VPg Proteins und C-terminal von den ersten 60 Aminosäuren der 3DL^{pol} flankiert (Abb. 17).

Die Expression von $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ in *E.coli* Zellen konnte im Immunoblot mit Hilfe eines polyklonalen anti- 3CL^{pro} Serums bestätigt werden (siehe 3.2.1.1; Abb.18). Die kotranslationale Spaltung des Vorläuferproteins in *E.coli* begann ca. 0,5 h nach Induktion der Expression, wie anhand einer Zeitreihe nachgewiesen werden konnte (Abb. 18, Spur3 und Abb. 19, Spur 3). 24 Stunden nach Expressionsbeginn in *E.coli* konnte das Vorläuferprotein $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ nicht mehr nachgewiesen werden. Nur das freigesetzte 3CL^{pro} Fragment war nachweisbar. Anhand der Expression von mutierten Vorläuferproteinen, bei denen das katalytische Zentrum der 3CL^{pro} inaktiviert wurde, konnte nach 24 h in *E.coli* nur das unprozessierte Vorläuferprotein nachgewiesen werden (Abb. 18, Spur 5). Dieser Kontrollversuch bestätigte die Vermutung, dass die Spaltung von $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ auf die spezifische *cis*-Aktivität der 3CL^{pro} zurückzuführen ist. In einer analogen Studie von Wirblich *et al.* wurde ebenfalls die Prozessierung eines Vorläuferproteins von RHDV, eines weiteren Mitglieds der *Caliciviridae*, in *E.coli* untersucht. Auch in diesen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Spaltung des Vorläuferproteins, katalysiert durch die *cis*-Aktivität der viruseigenen 3CL^{pro} , in der Freisetzung der 3CL^{pro} resultierte (Wirblich *et al.*, 1995). Für das feline Calicivirus konnte anhand der Expression des *ORF1* in einem *in vitro* Translationssystem ebenfalls nachgewiesen werden, dass die *cis*-Aktivität der 3CL^{pro} für die FCV-Polyproteinprozessierung notwendig ist (Sosnovtseva *et al.*, 1999). Die Freisetzung der 3CL^{pro} aus dem Norovirus-Dresden Vorläuferprotein $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ beruhte auf der Prozessierung des C-terminalen Spaltmotivs E/G zwischen der 3CL^{pro} und der 3DL^{pol} . Eine Verifizierung der Spaltung des N-terminalen Spaltmotivs E/A zwischen dem VPg Protein und der 3CL^{pro} nach Expression des Konstruktes pUS-NORII- $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ ET28b in *E.coli* nicht möglich. Das von dem Konstrukt pUS-NORII- $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ ET28b kodierte Vorläuferprotein wird nach Expression in ein N-terminales Peptid aus vier Aminosäuren kotranslational prozessiert werden, das im SDS-Gel nicht detektiert werden konnte. Um diese Fragestellung zu klären, wäre ein Edman-Abbau zur Proteinsequenzierung des N-terminalen Endes des Spaltproduktes 3CL^{pro} durchzuführen.

Das Konstrukt pUS-NORII- $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ IRES, das für die Expressionsstudien in 293T-Zellen generiert wurde, kodierte für das Vorläuferprotein $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$, das einen um 59 aa vergrößerten N-terminalen Bereich des VPg Proteins aufwies (siehe. $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ wurde in 293T-Zellen ebenfalls kotranslational gespalten, was anhand der Freisetzung der 19 kDa großen 3CL^{pro} im Immunoblot nachgewiesen werden konnte (3.2.1.2; Abb. 20, Spur 1).

Aufgrund der Freisetzung des 19 kDa großen 3CL^{pro} Fragmentes kann davon ausgegangen werden, dass sowohl an dem VPg3CL^{pro} Spaltmotiv als auch am Spaltmotiv zwischen 3CL^{pro}3DL^{pol} eine Spaltung stattfand. Als Kontrolle wurden Expressionsstudien des mutierten Vorläuferproteins Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol}, welches ein inaktives katalytisches Zentrum der 3CL^{pro} aufwies, durchgeführt. In diesen Studien konnte keine Spaltung des Vorläuferproteins Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} beobachtet werden (siehe Abb. 20, Spur 2). Demnach ist die Prozessierung des Vorläuferproteins Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} auch in der humanen 293T-Zellkultur strikt von der *cis*-Aktivität des 3CL^{pro} Fragmentes abhängig. Infolge der Translation des kompletten *ORF1* Polyproteins des Norovirus-Camberwell in humanen COS-Zellen, konnte ebenfalls die Freisetzung der 3CL^{pro} nachgewiesen werden (Seah *et al.*, 1999). Auch diese Expressionsstudien belegten, dass die Spaltung des Polyproteins auf der *cis*-Aktivität der 3CL^{pro} beruht.

In prokaryotischen Expressionsstudien mit dem Vorläuferprotein Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} konnte nach Beginn der kotranslationalen Spaltung zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Vorläuferprotein nachgewiesen werden (siehe 3.2.1.1; Abb. 19). Dies könnte darauf hindeuten, dass zunächst eine gewisse Ausgangskonzentration des Vorläuferproteins vorliegen muss, bevor die Prozessierungsreaktion starten kann. Vorstellbar wäre auch, dass die kotranslationale Spaltung des Vorläuferproteins nicht nur auf der *cis*-Aktivität der 3CL^{pro} beruht, sondern neu gebildete Vorläuferproteine gleichzeitig durch eine *trans* Aktivität der 3CL^{pro} prozessiert werden. Dies würde dem Virus eine schnellere und effizientere Spaltung des Polyproteins ermöglichen. Dagegen konnte bei den Expressionsstudien des Vorläuferproteins Δ VPg3CL^{pro} Δ 3DL^{pol} in 293T-Zellen, im Unterschied zu den Ergebnissen der prokaryotischen Expressionsstudien, auch 48 h *post* Transfektion, zusätzlich zum Spaltprodukt 3CL^{pro}, noch das unprozessierte Vorläuferprotein im Immunoblot nachgewiesen werden (siehe 3.2.1.2, Abb.20, Spur 1). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Expressionsstudien der Polyproteine des RHDV, des Norovirus Camberwell, des Norovirus MD145-12 sowie des murinen Norovirus (Belliot *et al.*, 2003; König *et al.*, 1998; Seah *et al.*, 1999; Sosnovtsev *et al.*, 2006). In diesen Studien konnte ebenfalls sowohl das 3CL^{pro} Spaltprodukt als auch das stabile Vorläuferprotein 3CL^{pro}3DL^{pol} detektiert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Spaltmotiv zwischen 3CL^{pro} und 3DL^{pol} bei der Polyproteinprozessierung des RHDV mit einer geringeren Effizienz prozessiert wird, als das Spaltmotiv zwischen VPg und 3CL^{pro} (Wirblich *et al.*, 1995). Dies weist darauf hin, dass die Polyproteinprozessierung durch unterschiedliche Spaltspezifitäten, die die 3CL^{pro} an der verschiedenen Spaltmotiven aufwies, reguliert wird.

Die unterschiedlichen Spaltspezifitäten der $3CL^{pro}$ verhindern vermutlich, dass das Polyprotein komplett in die einzelnen nicht-strukturellen Proteine prozessiert wird und gewährleisten dadurch, dass zusätzlich auch virale Vorläuferproteine freigesetzt werden. Die Vorläuferproteine wiederum können andere funktionale Domänen aufweisen und somit während der Virusreplikation andere Aktivitäten einnehmen als die einzelnen nicht-strukturellen Proteine.

Für das feline Calicivirus und das humanpathogene Sapovirus konnten in Expressionsstudien der *ORF1* in *in vitro* Translationsstudien nur das Vorläuferprotein $3CL^{pro}3DL^{pol}$ detektiert werden (Oka *et al.*, 2005; Sosnovtseva *et al.*, 1999). Eine Spaltung des Vorläuferproteins konnte nicht beobachtet werden. Demnach scheint sich die Prozessierung des Polyproteins zwischen den einzelnen Spezies der *Caliciviridae* zu unterscheiden.

4.1.2 *Trans*-Spaltung des Polyproteins

4.1.2.1 Prozessierung der Spaltmotive zwischen den Proteinen p37 und $2C^{NTPase}$ und zwischen der $2C^{NTPase}$ und dem Protein p20 *in trans*

Die kotranslationale Spaltung des vom *ORF1* kodierten Polyproteins ist bei den Polioviren, den Coronaviren sowie den Caliciviren nicht nur von der *cis*-Spaltaktivität der viruseigenen Protease abhängig (Blakeney *et al.*, 2003; Hanecak *et al.*, 1984; Ziebuhr *et al.*, 1995). Eine weitere Arbeitshypothese dieser Arbeit besagte, dass die Prozessierung des Polyproteins auch von der *trans*-Spaltaktivität der $3CL^{pro}$ abhängig ist. Als Substrat erkennt die $3CL^{pro}$ dabei spezifische Spaltmotive innerhalb des Polyproteins, was in der Freisetzung der strukturellen und nicht-strukturellen Proteine resultiert.

Wie bereits unter 4.1.1 diskutiert, wies die $3CL^{pro}$ an ihrem C-terminalen Spaltmotiv zwischen der $3CL^{pro}$ und der $3DL^{pol}$ eine geringere Spalteffizienz auf als an dem N-terminalen Spaltmotiv zwischen VPg und $3CL^{pro}$. Diese unterschiedlichen Spalteffizienzen ermöglichten, zusätzlich zur Freisetzung der $3CL^{pro}$, auch die Freisetzung eines stabilen Vorläuferproteins $3CL^{pro}3DL^{pol}$ (siehe 3.2.1.2, Abb. 20, Spur 1). Wie in einer Studie von Belliot *et al.* gezeigt wurde, weist das NV-Vorläuferprotein $3CL^{pro}3DL^{pol}$ ebenfalls eine proteolytische Aktivität auf (Belliot *et al.*, 2003). Aus dieser Studie leitete sich die zweite Hypothese dieser Arbeit ab, die besagte, dass die Prozessierungsspezifität des Vorläuferproteins $3CL^{pro}3DL^{pol}$ sich von der der $3CL^{pro}$ unterscheidet. Um diese Hypothesen zu untersuchen, wurden vergleichende *in vitro* Aktivitätsstudien des NV-Fusionsprotein $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ und des Einzelproteins $3CL^{pro}$ durchgeführt. Dafür wurden zunächst sowohl das infolge der kotranslationalen Prozessierung des Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ freigesetzte NV- $3CL^{pro}$ Fragment

(siehe 3.2.1.1, Abb. 17) als auch das NV-Fusionsprotein $3CL^{\text{pro}}_{\mu\text{E1189A}}3DL^{\text{pol}}$ in *E.coli* heterolog überexprimiert und spezifisch aufgereinigt (siehe 3.2.2.1; Abb. 21 und 3.2.2.2; Abb. 23). Anschließend erfolgte die Durchführung von *trans*-Aktivitätsassays, bei denen die beiden aufgereinigten Proteine $3CL^{\text{pro}}$ und $3CL^{\text{pro}}_{\mu\text{E1189A}}3DL^{\text{pol}}$ mit fünf verschiedenen synthetisch hergestellten Peptiden inkubiert wurden, die die putativen Spaltmotive innerhalb des NV-Polyproteins aufwiesen (siehe 2.1.10 und 3.2.3; Abb. 24). Die Analysen aller Spaltungsassays mit Hilfe der HPLC zeigten, dass die NV- $3CL^{\text{pro}}$ allein nur die Spaltstellen der Peptide $p37/2C^{\text{NTPase}}$ und $2C^{\text{NTPase}}/p20$ als Substrate erkannte und *in trans* prozessierte (siehe 3.2.3; Abb. 25 und Abb. 27). Die gleichen Peptide wurden auch von dem NV-Fusionsprotein $3CL^{\text{pro}}_{\mu\text{E1189A}}3DL^{\text{pol}}$ prozessiert (siehe 3.2.3.5, Abb. 31). Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die NV- $3CL^{\text{pro}}$ die Peptide $p37/2C^{\text{NTPase}}$ und $2C^{\text{NTPase}}/p20$ an dem Spaltmotiv Q/G in der Position P1P1' prozessierte (siehe 3.2.3.1, Abb. 26 und 3.2.3.2, Abb. 28). Die Peptide $p20/VPg$, $VPg/3CL^{\text{pro}}$ und $3CL^{\text{pro}}/3DL^{\text{pol}}$, die in ihren Spaltmotiven an der P1P1' Position nicht das Aminosäuremotiv Q/G sondern E/G bzw. E/A aufwiesen, wurden von der NV- $3CL^{\text{pro}}$ allein nicht prozessiert (siehe 3.2.3.3; Abb. 29). Laut einer Studie von Hardy *et al.* vermittelt allerdings nicht die Position P1P1' die Substratspezifität, sondern die Position P4 (Hardy *et al.*, 2002). Auch in dieser Position unterscheiden sich die nicht prozessierten Peptide von den prozessierten Peptiden. Im Gegensatz zu den Peptiden $p37/2C^{\text{NTPase}}$ und $2C^{\text{NTPase}}/p20$, die in der Position P4 die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin aufweisen, besitzen die Peptide in dieser Position keine aromatischen Aminosäuren (siehe Tab. 3; 2.1.10). Möglicherweise ist dies der Grund, weshalb sie von der $3CL^{\text{pro}}$ nicht als Substrat erkannt und prozessiert werden konnten. Um zu überprüfen, ob die Position P2 bzw. P3 eine Rolle in der Substraterkennung spielten, wurden die mutierten Peptide $p20/VPg\mu\text{TP2L}$ und $3CL^{\text{pro}}/3DL^{\text{pol}}\mu\text{TP3E}$ synthetisiert. Das Peptid $p20/VPg\mu\text{TP2L}$ wies an der Position P2 einen Aminosäureaustausch von Threonin zu Leucin auf. Das Peptid $3CL^{\text{pro}}/3DL^{\text{pol}}\mu\text{TP3E}$ wies anstatt der Aminosäure Threonin die Aminosäure Glutamat in Position P3 auf. Infolge dieser Aminosäureaustausche waren die Peptide $p20/VPg\mu\text{TP2L}$ und $3CL^{\text{pro}}/3DL^{\text{pol}}\mu\text{TP3E}$ in den Positionen P2 bzw. P3 identisch zu den Peptiden, die von der $3CL^{\text{pro}}$ als Substrat erkannt wurden (siehe Tab. 3; 2.1.10). Doch auch die auf diese Art und Weise mutierten Peptide wurden von der $3CL^{\text{pro}}$ nicht prozessiert (siehe 3.2.3.4, Abb. 30). Bereits in einer Studie von Wirblich *et al.* zur Charakterisierung der 3CL-Protease von RHDV konnte nachgewiesen werden, dass die Aminosäureposition P2 einen geringen Einfluss auf die Substratspezifität der 3CL hat (Wirblich *et al.*, 1995).

Ebenso wurde in einer Studie von Hardy *et al.* bestätigt, dass die Position P2 keinen Einfluss auf die Spaltaktivität der Norwalk Virus 3CL^{pro} hat (Hardy *et al.*, 2002).

4.1.2.2 Expressionsstudien des *ORF1* im zellfreien System zur Untersuchung der Initiation der Polyproteinprozessierung

Die Spaltung des Polyproteins *in trans* sollte anhand der Expression des kompletten *ORF1* des NV-GGII/4/Dresden/1997/GE im zellfreien System verifiziert werden. Anhand des Autoradiogramms des exprimierten NV-*ORF1* konnte nachgewiesen werden, dass das Vorläufer-Polyprotein in die Proteine p37, die 2C^{NTPase} sowie das 113 kDa große Vorläuferprotein p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol} gespalten wurde (siehe 3.2.5; Abb. 37, Spur 2 und 3). Zusätzlich wurden im zellfreien System *in vitro* Translationsassays mit einem mutierten Polyprotein, das ein inaktives katalytisches Zentrum der 3CL^{pro} aufwies, durchgeführt. In dieser Expressionsstudie konnte nur das unprozessierte 180 kDa große Polyprotein nachgewiesen werden (siehe 3.2.5; Abb. 37 Spur 4). Nach Zugabe der aufgereinigten 3CL^{pro} zum *in vitro* Translationsansatz des mutierten *ORF1* wurde das Polyprotein in das 113 kDa große Vorläuferprotein p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol} und in das Vorläuferprotein p372C^{NTPase} prozessiert. Die weitere Prozessierung von p372C^{NTPase} in seine Einzelproteine konnte ebenfalls schwach detektiert werden (siehe 3.2.5; Abb. 37 Spur 5). Dieses Ergebnis indizierte, dass das im NV-Polyprotein vorliegende 3CL^{pro} Fragment eine *trans*-Aktivität entwickelt, die essentiell für die Prozessierung des Polyproteins ist. Die initiale Prozessierung des Polyproteins in die Produkte p37 (bzw. p48 bei NV-GGI), p41 und p113, konnte anhand zahlreicher Expressionsstudien des *ORF1* anderer humaner Noroviren belegt werden. So wurde das *ORF1* kodierte Polyprotein des Norovirus Southhampton in prokaryotischen Expressionsstudien in das 48 kDa Protein, in das 41 kDa Protein (2C^{NTPase}) sowie in das 113 kDa große Vorläuferprotein gespalten (Liu *et al.*, 1996). Auch für diesen Prozessierungsschritt konnte die proteolytische *trans*-Aktivität der 3CL^{pro} verantwortlich gemacht werden. Ähnliche Ergebnisse wurden im Rahmen von *in vitro* Translationsstudien des Norwalk Virus Polyproteins erzielt (Blakeney *et al.*, 2003). In diesen Versuchen konnten ebenfalls nur die Freisetzung des 48 kDa Proteins, des 41 kDa Proteins (2C^{NTPase}) sowie des 113 kDa Proteins, nach Expression und kotranslationaler Spaltung des Polyproteins, dokumentiert werden. Eine weitere Prozessierung des Vorläuferproteins p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol} konnte in keiner dieser Studien beobachtet werden.

Diese Ergebnisse belegten, dass der initiale Schritt der Polyproteinprozessierung an den Spaltnativen zwischen dem Protein p37 und der $2C^{NTPase}$ sowie zwischen der $2C^{NTPase}$ und dem Protein p20 stattfindet. Dieser Prozessierungsschritt wird von der *trans*-Spaltungsaktivität der $3CL^{pro}$ katalysiert.

4.1.2.3 Charakterisierung der sequentiellen Prozessierung des N-Terminalen Bereiches des Polyproteins

Die dritte Arbeitshypothese dieser Arbeit besagte, dass $3CL^{pro}$ und sein Vorläuferprotein die $3CL^{pro}3DL^{pol}$ die Spaltnative des Polyproteins mit unterschiedlichen Spalteffizienzen prozessieren und somit eine Regulation der Polyproteinprozessierung gewährleisten. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die Spaltspezifitäten und die relativen Spalteffizienzen berechnet, mit denen die NV- $3CL^{pro}$ und das Fusionsprotein $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ die Schnittstellen prozessierten. Die Spalteffizienz der NV- $3CL^{pro}$ war dabei an den Peptiden p37/ $2C^{NTPase}$ und $2C^{NTPase}$ /p20 signifikant höher als die des NV-Fusionsproteins $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ (siehe 3.2.3.7, Abb. 35 A). Demnach schien für die Prozessierung dieser Motive das $3CL^{pro}$ Fragment verantwortlich zu sein. Doch auch als Teil des Fusionsproteins $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ blieb die *trans*-Spaltaktivität von $3CL^{pro}$ erhalten (siehe 3.2.3.5, Abb. 31 und 3.2.3.7, Abb. 35). Die $3CL^{pro}$ spaltete das Peptid $2C^{NTPase}$ /p20 deutlich effizienter als das Peptid p37/ $2C^{NTPase}$ (siehe Abb. 35 A). Anhand dieses Ergebnisses konnte gezeigt werden, dass die $3CL^{pro}$ eine höhere Spezifität zu dem Spaltnativ zwischen der $2C^{NTPase}$ und dem Protein p20 aufwies als zu dem Spaltnativ zwischen dem N-terminalen Protein p37 und der $2C^{NTPase}$. Beim Vergleich der Aminosäurereste an den Positionen P4-P2` (siehe 2.1.10) fiel auf, dass nur die Aminosäuren an Position P4 voneinander abwichen. Das Peptid p37/ $2C^{NTPase}$ wies in Position P4 die Aminosäure Tyrosin auf und das Peptid $2C^{NTPase}$ /p20 die Aminosäure Phenylalanin. Bei beiden Aminosäuren handelt es sich um aromatische Aminosäuren. Wie zuvor bereits erwähnt, konnte in einer Studie von Hardy *et al.* eindeutig nachgewiesen werden, dass der Aminosäurerest an Position P4 die Substratspezifität der NV- $3CL^{pro}$ vermittelt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Phenylalanin mit der nicht-aromatischen Aminosäure Glycin an Position P4 im Spaltnativ zwischen dem N-terminalen Protein p48 und der $2C^{NTPase}$ eine Prozessierung der Spaltstelle fast vollständig verhinderte. Der Austausch von Phenylalanin mit Tyrosin an dieser Position reduzierte die Spaltungseffizienz ebenfalls (Hardy *et al.*, 2002).

Diese Ergebnisse indizierten, dass die Spezifität der NV-3CL^{pro} für Phenylalanin an Position P4 höher war als für Tyrosin. Hieraus könnten sich auch die unterschiedlichen Spalteffizienzen, mit denen die NV-3CL^{pro} die Peptide p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20 spaltet, erklären. Eine effizientere Spaltung des Spaltemotivs 2C^{NTPase}/p20, im Vergleich zu der Spaltung des Spaltemotivs p37/2C^{NTPase}, konnte auch im Rahmen des *in vitro* Translationsassays nachgewiesen werden.

Bei der Koinkubation eines NV-Polyproteins, das im aktiven Zentrum der 3CL^{pro} eine Mutation aufwies, mit der aufgereinigten 3CL^{pro} konnte primär das Vorläuferprotein p372C^{NTPase} nachgewiesen werden (siehe 3.2.5, Abb. 37 Spur 5). Die Spaltprodukte von p372C^{NTPase} konnten nur sehr schwach detektiert werden. Dieses Ergebnis wies zusätzlich darauf hin, dass die initiale Prozessierung des Polyproteins am Spaltemotiv zwischen der 2C^{NTPase} und dem p20 Protein beginnt. Die unterschiedlichen Substratspezifitäten der 3CL^{pro} ermöglichen vermutlich eine sequentielle Spaltung des Polyproteins, welche möglicherweise zur Folge hat, dass der Vorläufer p372C^{NTPase} nicht komplett in seine Einzelproteine gespalten wird. Dies deutet darauf hin, dass das NV-Vorläuferprotein während der viralen Replikation eine andere Funktion ausübt als die prozessierten Einzelproteine.

4.1.2.4 Prozessierung des Vorläuferproteins p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol}

In einer *in vitro* Translationsstudie von Belliot *et al.* wurde die Prozessierung des vom *ORF1* kodierten Polyproteins des NV-GGII MD145-12 in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Nach 2-stündiger Expressionszeit konnten in dieser Studie ebenfalls die Spaltprodukte p37, p40 (2C^{NTPase}) sowie das Vorläuferprotein p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol} nachgewiesen werden (Belliot *et al.*, 2003). Nach Verlängerung der Translationszeit auf 24 h wurde in dieser Studie auch eine weitere Spaltung von p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol} in die einzelnen nicht-strukturellen Proteine beobachtet. Laut dieser Studie wird die Spaltung von p20VPg3CL^{pro}3DL^{po} durch eine *trans*-Spaltungsaktivität der 3CL^{pro} katalysiert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die mit Hilfe der *in vitro trans*-Spaltungstests im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit erzielt wurden. Die während dieser Arbeit durchgeführten Spaltungstests zeigten eindeutig, dass das Spaltemotiv zwischen dem Protein p20 und VPg nicht durch die *trans*-Aktivität der 3CL^{pro} prozessiert wird (siehe 3.2.3.6, Abb. 32). Die Differenzen zwischen den Ergebnissen von Belliot *et. al* und den Ergebnissen der Spaltungstests dieser Arbeit sind eventuell auf die unterschiedlichen Versuchsdurchführungen zurückzuführen.

Während in der hier vorgestellten Arbeit die Spaltung des NV-Polyproteins anhand der Prozessierung von Peptiden, die die authentischen Spaltmotive des NV-Polyproteins aufwiesen, untersucht wurde, verwendete Belliot *et. al* das *in vitro* Translationsystem. Möglicherweise findet während der Verlängerung der Translationszeit in diesem System eine Degradierung der Vorläuferproteine statt, da laut Herstellerangaben eine zweistündige Inkubationszeit des Translationsansatzes nicht überschritten werden soll.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, die besagte, dass das NV-Vorläuferprotein p20VPg nur im eukaryotischen Zellsystem durch die NV-3CL^{pro} gespalten wird, die dafür möglicherweise mit zellulären Faktoren interagieren muss. Für die Untersuchung dieser Hypothese wurde das 3CL^{pro} Vorläuferprotein ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} mit dem p20VPg Vorläuferprotein in humanen 293T-Zellen kotransfiziert. Jedoch konnte auch in diesen Koexpressionsstudien eine Spaltung von p20VPg nicht nachgewiesen werden (siehe 3.2.4, Abb. 36 A, Spur 2). Dies wies erneut darauf hin, dass die 3CL^{pro} *trans*-Aktivität allein nicht für die Prozessierung des Spaltmotivs zwischen dem Protein p20 und VPg verantwortlich sein kann. Studien zur Spaltung des Poliovirusvorläuferproteins 3AB, des analogen Vorläuferproteins zu dem NV-Vorläuferprotein p20VPg, schlugen vor, dass zunächst ein Tyrosinrest des 3B Proteins (analog zum NV-VPg) uridyliert werden muss, bevor 3AB gespalten werden kann (Kuhn, 1987; Takegami *et al.*, 1983). In Expressionsstudien des *ORF1* Polyproteins des murinen Norovirus in *E.coli* konnte eine Prozessierung des Vorläuferproteins p18VPg (homolog zum NV-p20VPg) ebenfalls nicht beobachtet werden (Sosnovtsev *et al.*, 2006). Interessanterweise konnte aber in der gleichen Studie eine Prozessierung von p18VPg beobachtet werden, nachdem eine Makrophagenzelllinie mit dem murinen Norovirus infiziert wurde. Dieses Ergebnis weist möglicherweise darauf hin, dass funktionale virale Proteine in der Zelle vorliegen müssen, die einerseits an der Prozessierung des noroviralen Vorläuferproteins p20VPg beteiligt sind und andererseits Wechselwirkungen untereinander eingehen können. Des weiteren wäre vorstellbar, dass Wechselwirkungen zwischen den viralen Proteinen und zellulären Faktoren der Wirtszelle für die Prozessierung dieses Motivs mit verantwortlich sind.

Im nächsten Abschnitt soll die Prozessierung an den Spaltmotiven zwischen dem VPg-Protein und der 3CL^{pro} sowie zwischen der 3CL^{pro} und der 3DL^{pol} diskutiert werden. Anhand der Spaltungsstudien des NV-Vorläuferproteins ΔVPg3CL^{pro}Δ3DL^{pol} konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung der Spaltmotive zwischen der 3CL^{pro} und der 3DL^{pol} *in cis* erfolgte (siehe 3.2.1.1, Abb. 18; 3.2.1.2, Abb.19 und Diskussion 4.1.1).

Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass das Spaltmotiv zwischen dem VPg Protein und der $3CL^{pro}$ nicht nur *in cis* durch die $3CL^{pro}$, sondern auch *in trans* durch das Fusionsprotein $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ prozessiert wurde (siehe 3.2.3.6, Abb. 33). Von der NV- $3CL^{pro}$ allein kann dieses Motiv *in trans* nicht prozessiert werden (siehe 3.2.3.3, Abb. 29 C+D). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass möglicherweise das Spaltmotiv zwischen dem VPg-Protein und der $3CL^{pro}$ nur dann *in cis* prozessiert werden kann, wenn die $3CL^{pro}$ in Form des Vorläuferprotein $3CL^{pro}3DL^{pol}$ vorliegt. Denkbar wäre, dass nur in diesem Fall das Vorläuferprotein die geeignete Konformation aufweist, um das Spaltmotiv zwischen VPg und $3CL^{pro}$ als Substrat zu erkennen und zu spalten. Anhand der Expression des Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}3DL^{pol}$ in 293T-Zellen konnte dessen Prozessierung sowohl an dem Spaltmotiv zwischen VPg und $3CL^{pro}$ als auch an dem Spaltmotiv zwischen der $3CL^{pro}$ und der $3DL^{pol}$ nachgewiesen werden (siehe 3.2.1.2, Abb. 20, Spur 1). Vorstellbar wäre demnach, dass die ersten 60 Aminosäuren des $3DL^{pol}$ -Anteils des $\Delta VPg3CL^{pro}3DL^{pol}$ Vorläuferproteins bereits ausreichen, um die optimale Konformation für die Spaltung des VPg $3CL^{pro}$ Spaltmotivs zu ermöglichen. Um diese These zu untersuchen, müssten Mutanten des $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$ Vorläuferproteins hergestellt werden, die unterschiedlich verkürzte C-Termini aufweisen. Nach Aufreinigung dieser verkürzten $3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ Vorläuferproteine könnten sie für Prozessierungsstudien an dem Peptid VPg/ $3CL^{pro}$ verwendet werden.

4.1.3 Sequentielle und differentielle Prozessierung des Polyproteins

Anhand der Diskussion der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Regulation der Polyproteinprozessierung kann folgende sequentielle und differentielle Spaltung vorgeschlagen werden (Abb. 42):

- Der initiale Schritt der Polyproteinprozessierung beruht auf der *trans*-Aktivität des $3CL^{pro}$ Fragmentes im Polyprotein-Vorläufer. Die Prozessierung erfolgt dabei am Spaltmotiv Glutamin/Glycin (Q/G), das sich zwischen den Proteinen p37 und der $2C^{NTPase}$ sowie zwischen der $2C^{NTPase}$ und dem Protein p20 befindet. Der initiale Schritt resultiert in der Freisetzung der Proteine p37, $2C^{NTPase}$ und dem Vorläuferprotein p20VPg $3CL^{pro}3DL^{pol}$.
- Anhand von Spaltstudien des im aktiven Zentrums der $3CL^{pro}$ mutierten Polyproteins, unter Verwendung des *in vitro* Translationsassays, konnte nachgewiesen werden, dass die Prozessierung zwischen den Proteinen $2C^{NTPase}$ und p20 beginnt.

Mittels der berechneten Spalteffizienzen konnte gezeigt werden, dass das Spaltmotiv zwischen der $2C^{NTPase}$ und dem Protein p20 mit einer höheren Spezifität von der $3CL^{pro}$ erkannt wird als das Spaltmotiv zwischen den Proteinen p37 und der $2C^{NTPase}$. Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals die Vermutung, dass das Spaltmotiv $2C^{NTPase}$ p20 effizienter von der $3CL^{pro}$ gespalten wird als das Spaltmotiv p37/ $2C^{NTPase}$. Diese Spezifitätsunterschiede gewährleisten die sequentielle Spaltung des Polyproteins, wodurch vermutlich ermöglicht wird, dass sowohl das Vorläuferprotein p372C^{NTPase} als auch dessen Spaltprodukte unterschiedliche Aktivitäten im Verlauf der Virusreplikation entfalten können.

- Die weitere Spaltung des Vorläuferproteins p20VPg3CL^{pro}3DL^{pol} basiert auf der *cis*-Aktivität des $3CL^{pro}$ Fragmentes. Die Prozessierung beginnt zunächst an dem N-terminalen Ende der $3CL^{pro}$ am Spaltmotiv E/A, so dass die Vorläuferproteine $3CL^{pro}$ 3DL^{pol} und p20VPg freigesetzt werden. Anhand der Ergebnisse der *trans*-Spaltungsassays kann vermutet werden, dass für die Prozessierung des Spaltmotivs E/A zwischen dem VPg Protein und der $3CL^{pro}$ die Konformation des Vorläuferproteins $3CL^{pro}$ 3DL^{pol} notwendig ist.
- Die Prozessierung des Vorläuferproteins $3CL^{pro}$ 3DL^{pol} ist von der *cis*-Aktivität der $3CL^{pro}$ abhängig und resultiert in der Freisetzung von $3CL^{pro}$ und 3DL^{pol}. Expressionsstudien des Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ im eukaryotischen Zellsystem indizieren, dass das Vorläuferprotein $3CL^{pro}$ 3DL^{pol} nicht komplett prozessiert wird. Dadurch wird gewährleistet, dass das Vorläuferprotein $3CL^{pro}$ 3DL^{pol} eine andere Funktion im Rahmen der noroviralen Replikation einnehmen kann als $3CL^{pro}$ allein.
- Die Prozessierung des Vorläuferproteins p20VPg scheint nicht allein von der katalytischen Aktivität der $3CL^{pro}$ abhängig zu sein. Wahrscheinlich sind zelluläre Faktoren oder Wechselwirkungen viraler Proteine untereinander an der Prozessierung dieses Motivs beteiligt.

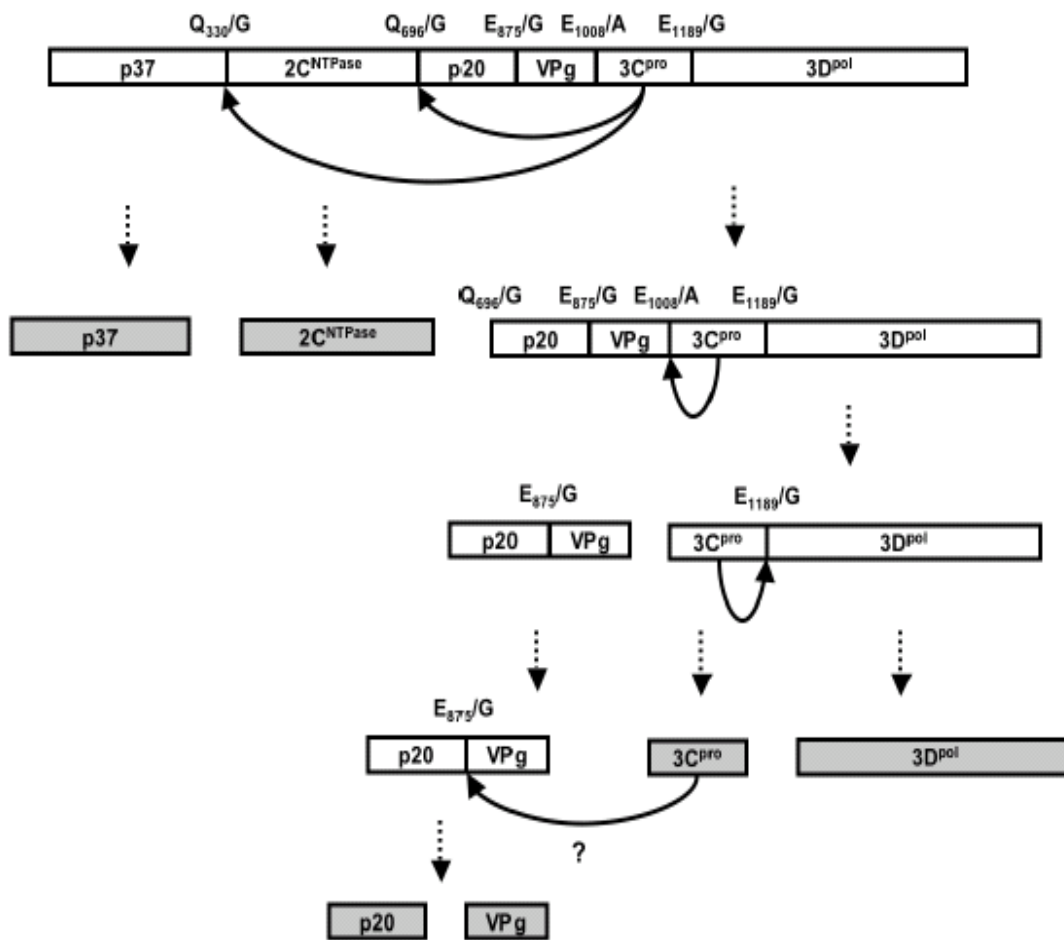


Abbildung 42: Schematische Darstellung der differentiellen und sequentiellen Spaltung des NV-Polyproteins durch $3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}_{\mu E1189A}3DL^{pol}$

Die Abfolge der Freisetzung der NV-Vorläuferproteine und der nicht-strukturellen Proteine basiert sowohl auf der Berechnung der Spalteffizienzen von $3CL^{pro}$ und $3CL^{pro}3DL^{pol}$ als auch auf der Berechnung der relativen Spalteffizienzen mit der die Peptide prozessiert werden. In einem ersten Schritt spaltet $3CL^{pro}$ in trans die Spaltmotive zwischen der $2C^{NTPase}$ /p20 und die p37/ $2C^{NTPase}$. Hierdurch werden die Proteine p37, $2C^{NTPase}$ und das Vorläuferprotein p20VPg $3CL^{pro}3DL^{pol}$ freigesetzt. Anschließend erfolgt die Prozessierung an der VPg/ $3C^{pro}$ Spaltstelle, katalysiert durch das Fusionsprotein $3CL^{pro}3DL^{pol}$. Dieser Prozessierungsschritt resultiert in der Freisetzung der Vorläuferproteine p20VPg und $3CL^{pro}3DL^{pol}$. Die weitere Spaltung des Fusionsproteins $3CL^{pro}3DL^{pol}$ basiert auf der cis-Aktivität der $3CL^{pro}$ und ermöglicht die Freisetzung der $3CL^{pro}$ und der $3DL^{pol}$. Die Spaltung des p20VPg Vorläuferproteins ist nicht von der katalytischen Aktivität der NV- $3CL^{pro}$ abhängig. Wahrscheinlich sind zelluläre Faktoren in die Prozessierung dieses Vorläuferproteins involviert. Die stabilen Spaltprodukte sind grau hervorgehoben. Die Spaltmotive innerhalb des Norovirus-Polyproteins sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

4.2 Regulation der 3CL^{pro} Aktivität durch das Vorläuferprotein p20VPg

Die Koexpression des Vorläuferproteins p20VPg mit dem 3CL^{pro} Vorläuferprotein $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ in 293T-Zellen verhinderte komplett die kotranslationale Spaltung von $\Delta\text{VPg}3\text{CL}^{\text{pro}}\Delta 3\text{DL}^{\text{pol}}$ (siehe 3.2.4, Abb. 36 B, Spur 2). Dieses Ergebnis führte zur Aufstellung der Arbeitshypothese, dass das Vorläuferprotein p20VPg die Aktivität der 3CL^{pro} verringert. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde im Rahmen des *in vitro trans* Aktivitätsassays die gereinigte 3CL^{pro} mit dem aufgereinigten Vorläufer p20VPg und den Peptiden p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20 koinkubiert. In diesen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Spalteffizienz der 3CL^{pro} verringert wurde, wenn dem Reaktionsansatz des *trans*-Spaltungsassays 1 μM des aufgereinigten p20VPg Vorläuferproteins zugegeben wurde (siehe 3.2.7.2, Abb. 40). Dabei war eine signifikante Reduktion der Spalteffizienz des Peptids p37/2C^{NTPase} zu beobachten. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass p20VPg die 3CL^{pro} Aktivität negativ reguliert. Bei Poliovirus konnte ebenfalls beobachtet werden, dass ein viruseigenes Protein die Aktivität der 3CL-Protease negativ reguliert (Banerjee *et al.*, 2004). Analog zu den Studien der hier vorgestellten Arbeit konnte in der Studie von Banerjee *et al.* beobachtet werden, dass die Koexpression des Poliovirus 2C-Proteins mit dem Poliovirus Polyprotein eine ineffiziente Prozessierung des Polyproteins zur Folge hat. Das Poliovirus 2C-Protein weist neben NTP-Bindungsdomänen auch Sequenzen auf, die für die Membranbindung notwendig sind. Für das Norovirusprotein p20 wird ebenfalls vermutet, dass es sich um ein Membranprotein bzw. um ein Membran assoziiertes Protein handelt (Hardy, 2005). Demnach könnten beide Proteine vergleichbare Funktionen in der Virusreplikation aufweisen. Auch beim Influenzavirus konnte für das viruseigene membranbindende Protein M1 eine negative Regulation der viruseigenen Proteasedomäne PA nachgewiesen werden (Hara *et al.*, 2003). In der Studie von Hara *et al.* wurde eine direkte Interaktion zwischen M1 und der Protease PA beschrieben. Banerjee *et al.* vermuten ebenfalls, dass die Inhibierung der Poliovirus 3C-Protease durch eine physische Interaktion mit dem Poliovirus 2C-Protein erfolgte. Diese Vermutung wird zusätzlich dadurch erhärtet, da das Poliviruseprotein 2C Serpindomänen besitzt, die, analog zu zellulären Serpins, das aktive Zentrum der Proteasen durch eine direkte Bindung inhibieren können (Gettins, 2002; Ye and Goldsmith, 2001). Banerjee *et al.* vermuteten darüber hinaus, dass eine Modifizierung der PV-3C-Protease-Aktivität durch das PV-2C-Protein essentiell ist für eine regulierte Prozessierung des Polyproteins.

Im Speziellen wird angenommen, dass die Funktionalität des PV-Replikationskomplexes durch eine Modellierung der Aktivität der PV-3C-Protease gewährleistet wird. Der membranassoziierte PV-Replikationskomplex könnte demnach von einem Protein, das ebenfalls membrangebunden vorliegt, spezifisch reguliert werden. Bei dem Poliovirusprotein 2C handelt es sich möglicherweise um ein membranassoziiertes Protein. Aus diesem Grund wäre es ein geeigneter Kandidat für die Regulation verschiedener Komponenten des Replikationskomplexes. Wie bereits unter 4.1.1 diskutiert wurde, erfolgt eine Uridylylierung des 3B Proteins (NV-VPg), während es noch im Vorläuferprotein 3AB vorliegt (Paul *et al.*, 2003). Erst danach erfolgt die Prozessierung von 3AB. Die Uridylylierung des 3B Proteins (NV-VPg Protein) ist die Voraussetzung für die Initiation der RNA-Synthese durch die viruseigene RdRp-Polymerase im Replikationskomplex. Banerjee *et al.* vermuteten folglich, dass eine Verlängerung der Halbwertszeit von 3AB essentiell für die korrekte Initiation der RNA-Synthese sei. Darüber hinaus wurde angenommen, dass die Inhibierung der PV-3C^{pro} durch die PV-2C bereits im Cytoplasma erfolgt. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass solange das Poliovirus 2C-Protein im Cytoplasma frei vorliegt, die Prozessierung von 3AB verhindert wird. Möglicherweise wird die Interaktion zwischen der PV-2C und der PV-3C aufgehoben, wenn die PV-2C im Replikationskomplex membrangebunden vorliegt. Erst für einen funktionalen Replikationskomplex wäre die Prozessierung von 3AB notwendig, so dass 3A und 3B unterschiedliche, spezifische Funktionen bei der Virusreplikation wahrnehmen können. Die Inhibierung der NV-3CL^{pro} durch das NV-Potein p20 könnte ebenfalls für die Regulation der Prozessierung des Vorläuferproteins p20VPg notwendig sein, um ähnlich wie bei Poliovirus, eine effiziente Initiation der RNA-Synthese zu ermöglichen.

4.3 Expression des NV-Volle Länge Klons in 293T-Zellen

Die sequentielle und differentielle Prozessierung des NV-Polypeptids sollte infolge der Expression des NV-Volle-Länge-Klon pUS-NOR-VLIRES in der humanen Nierenendothelzelllinie 293T verifiziert werden. Untersuchungen zum initialen Schritt der Norovirusreplikation infolge der Infektion eines Zellsystems mit dem humanpathogenen NV sind *bis dato* nicht möglich, da das humanpathogene Norovirus nicht im Zellsystem angezüchtet werden kann. Cheetham *et al.* war es 2006 zum ersten Mal gelungen, Meerschweinchen mit dem humanpathogenem Norovirus zu infizieren (Cheetham *et al.*, 2006). Dieses System könnte demnach in Zukunft eine Grundlage zur Erforschung der Replikation und Pathogenese des humanen Norovirus darstellen. Des Weiteren wurde ein murines Norovirus identifiziert, das bei Mäusen ebenfalls Durchfallerkrankungen auslöst. Zusätzlich kann es in dendritischen Zellen und Makrophagen angezüchtet werden (Karst *et al.*, 2003; Wobus *et al.*, 2004). Das murine Norovirus stellt somit ebenfalls in Zukunft ein potentiell System zur Erforschung der Pathogenese des Norovirus dar.

Um trotz des fehlenden Zellsystems zur Anzüchtung von Noroviren *in vivo* Untersuchungen zur kotranslationalen Prozessierung des NV-Polypeptids im eukaryotischen Zellsystem durchführen zu können, wurde der NV-Volle-Länge-Klon pUS-NOR-VLIRES in 293T-Zellen transfiziert. Mit Hilfe des Immunoblots sollte unter Verwendung verschiedener NV-spezifischer polyklonaler Seren zunächst die Expression des vom *ORF1* kodierten Polypeptids, bzw. dessen Spaltprodukte, nachgewiesen werden. Mit keinem der verwendeten Seren konnte mit Hilfe des Immunoblots das Polypeptid detektiert werden (siehe Anhang 2). Kräusslich *et al.* konnten in Expressionsstudien des Poliovirus-Polypeptids dieses ebenfalls nicht nachweisen. Die Autoren vermuteten, dass aufgrund der kotranslationalen Prozessierung des Polypeptids, dieses sofort nach der Expression in die einzelnen nicht strukturellen Proteine gespalten wurde und aus diesem Grund das Polypeptid nicht nachweisbar war (Kräusslich *et al.*, 1988).

Doch auch die NV-nicht-strukturellen Proteine (siehe Anhang 2; A+B) sowie das vom *ORF2* kodierte Kapsidprotein (siehe Anhang 2; C) konnte im Immunoblot, unter Verwendung der polyklonalen Seren, nicht detektiert werden. Möglicherweise war die Sensitivität des Immunoblots nicht ausreichend hoch genug um die viralen Proteine in diesen Expressionsstudien nachzuweisen.

In einer Studie von Asanaka *et al.* wurde ein Volle-Länge cDNA-Klon des Norwalk Virus, der Prototyp der humanen Noroviren, in 293T-Zellen exprimiert. Die Translation des cDNA-

Genoms erfolgte dabei mit Hilfe eines replikationsdefizienten Vaccinia-Virus Systems unter Kontrolle des T7-Promotors. Unter Anwendung eines Radioimmunopräzipitationsassays (RIPA), der wesentlich sensitiver ist als der Immunoblot, war es in dieser Studie möglich, die nicht-strukturellen Proteine 3CL^{pro} und 3DL^{pol} nachzuweisen (Asanaka *et al.*, 2005). Eine Immunopräzipitation zur Aufkonzentration der noroviralen Proteine im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnte nicht durchgeführt werden, da die vorliegenden polyklonalen Seren die entsprechenden Epitope im nativen Zustand nicht erkannten. Allerdings scheint das Problem, weshalb die noroviralen Proteine in dieser Arbeit nicht detektiert werden konnten, nicht an einem Sensitivitätsproblem des Detektionssystems *per se* zu liegen. In Translationsstudien eines Sapovirus Volle-Länge cDNA-Klons, die ebenfalls mit dem pIRES Expressionssystem in 293T-Zellen durchgeführt wurden, konnten im Immunoblot, unter Verwendung polyklonaler Seren, die 3DL^{pol} und das Kapsid Protein als Spaltprodukte des ORF1 Polyproteins detektiert werden (J. Gebhardt, *Calicilab*; persönliche Mitteilung).

Im Rahmen der Diplomarbeit von D. Kramer (Kramer, 2007) wurden zwei verschiedene Volle-Länge-cDNA-Klone des feline Calicivirus (FCV) in 293T-Zellen exprimiert. Von einem dieser beiden cDNA Klone konnten in den 293T-Zellen infektiöse Viruspartikel nachgewiesen werden. Im anschließenden Immunoblot der geernteten Zelllysate, unter Verwendung polyklonaler Seren, konnte die 3DL^{pol} als Spaltprodukt des Polyproteins detektiert werden. Nach Transfektion des zweiten FCV Volle-Länge cDNA Klons in 293T-Zellen wurden keine infektiösen Partikel gebildet. Somit konnte auch im Immunoblot dieser Zelllysate das nicht-strukturelle Protein 3DL^{pol} nicht detektiert werden (D. Kramer, *Calicilab*; persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die nicht-strukturellen Proteine nur dann im Immunoblot detektiert werden können, wenn infolge der Transfektion eine Virusreplikation stattgefunden hat. Voraussetzung für die Virusreplikation ist die Freisetzung einer aktiven 3DL^{pol}, die in der Lage ist, neue Virusgenome zu generieren. Das durch die 3DL^{pol} vervielfältigte virale Genom lag nun in der Wirtszelle in hoher Kopienzahl vor und diente als mRNA für die Translation zusätzlicher Polyproteine. Die kotranslationale Spaltung der zusätzlich exprimierten Polyproteine führte zur Freisetzung einer hohen Anzahl von viralen, nicht-strukturellen Proteinen, die nun in einer ausreichenden Konzentration vorlagen, um im Immunoblot detektiert werden zu können. Die Ergebnisse der Expression der FCV-Volle-Länge cDNA Klone verwiesen darauf, dass im Immunoblot nur dann virale Proteine detektiert werden können, wenn von dem viralen cDNA-Klon funktionale virale Proteine exprimiert werden.

Für den vorliegenden Norovirus cDNA Klon pUS-NORII-VLIREs würde dies bedeuten, dass möglicherweise das 180 kDa große Protein exprimiert wurde, eventuell sogar kotranslational gespalten wurde, aber die freigesetzten viralen Proteine nicht in der Lage waren, das NV-RNA Genom zu replizieren. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass der NV-Volle-Länge-Klon gar nicht exprimiert wurde.

4.4 Inhibierung der 3CL^{pro} Aktivität

Auf der 3CL^{pro} Aktivität beruht der initiale Schritt der Virusreplikation. Aus diesem Grund könnte eine spezifische Inhibierung der 3CL^{pro} die komplette Replikation und Pathogenese des Norovirus verhindern. Demnach stellt die 3CL^{pro} ein geeignetes Targetmolekül für die Entwicklung von antiviralen Medikamenten dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sechs verschiedene Substanzen, XP-10, XP-17, XP-40, XP-41, α -MAPI und der CMK-Inhibitor auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der 3CL^{pro} getestet (siehe 3.3). Zunächst wurden die XP-Substanzen getestet, die vom Institut für Biochemie der Universität Lübeck zur Verfügung gestellt wurden. Keine dieser Substanzen wies einen IC₅₀-Wert auf, der unter 100 μ M lag. Ein IC₅₀-Wert bei einer Konzentration von deutlich unter 100 μ M gilt als Grenzwert für potentielle Inhibitoren. Bei IC₅₀-Werten über 100 μ M kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Substanz *per se* für das jeweilige Enzym toxisch ist. Darüber hinaus können solch hohe Konzentrationen eines chemischen Stoffes toxische Effekte auf den Organismus bzw. die Zielzellen auslösen, was die therapeutische Breite eines eventuellen späteren Medikamentes einschränken würde. Aus diesen genannten Gründen sind die getesteten XP-Substanzen als potentielle NV-3CL^{pro} Inhibitoren nicht geeignet.

Die getestete Substanz α -MAPI (*anti-microbial alkaline protease inhibitor*) ist ein Peptidaldehyd. Peptidaldehyde wirken als Inhibitoren für Serin- und Cysteinproteasen, indem sie mit den katalytischen Zentren der Proteasen interagieren und diese inaktivieren (Schultz *et al.*, 1989; Westerik and Wolfenden, 1972). Eine Studie von Sarubbi *et. al* zeigte, dass α -MAPI einen potentieller Inhibitor (IC₅₀=0,9 μ M) der Aspartyl-Protease von HIV darstellt (Sarubbi *et al.*, 1993). Darüber hinaus wirkt diese Substanz auch als Inhibitor für Subtilisin und andere mikrobielle Proteasen (Sarubbi *et al.*, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte getestet werden, ob α -MAPI auch die NV-3CL^{pro} inhibieren kann. Anhand der Inhibierungsversuche der NV-3CL^{pro} durch α -MAPI konnte ein IC₅₀-Wert

von 294 μM bestimmt werden (siehe Abb. 41). Dieser hohe IC_{50} -Wert schließt die Substanz α -MAPI als potentiellen Inhibitor für die NV-3CL^{pro} aus.

Im Gegensatz zur NV-Protease, bei der es sich um eine Cystein-Protease handelt, handelt es sich bei Subtilisin um eine Serin-Protease. Die katalytische Triade von Subtilisin ist aus den Aminosäuren Ser-His-Asp aufgebaut (Polgar, 2005). Im Gegensatz dazu besteht die katalytische Triade der NV-3CL^{pro} aus den Aminosäuren Cys-His-Glu (Zeitler *et al.*, 2006). Die unterschiedlichen katalytischen Triaden von Subtilisin und der NV-3CL^{pro} sind möglicherweise die Ursache für die unterschiedlichen Wirkungsweisen von α -MAPI.

Die Substanz CMK (*Chloromethyl ketone inhibitor*) ist ein sehr effizienter Inhibitor der SARS-Coronavirus Protease (SARS-CoV M^{pro}) (Anand *et al.*, 2003). Bei der Substanz CMK handelt es sich um ein Hexapeptid, an welches ein Chlormethylketonrest synthetisiert wurde. Das Hexapeptid präsentierte ein spezifisches Substrat der SARS-Coronavirus Protease (SARS-CoV M^{pro}). Anhand von Strukturanalysen wurde nachgewiesen, dass die Faltung der Domänen I und II der SARS-CoV M^{pro} der Faltung der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen entspricht (Yang *et al.*, 2003). Allerdings besteht ihr aktives Zentrum aus einer katalytischen Dyade, die aus einem Cystein und einem Histidin aufgebaut ist. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeiten zur 3CL-Protease der *Picornaviridae* wird sie oft als 3CL-Protease (*3C-like protease*) bezeichnet. In von Yang *et al.* durchgeführten Kristallographiestudien zur Bindung des CMK-Inhibitor an die SARS-CoV M^{pro} konnte dargestellt werden, wie der CMK-Inhibitor spezifisch mit der Substratbindestelle der M^{pro} interagieren kann. Die Wirkungsweise des CMK-Inhibitors beruht dabei zunächst auf der Bindung des Hexapeptidsubstrates mit der Substratbindestelle der M^{pro}. Dabei wurde eine kovalente Bindung zwischen dem Schwefelatom des Cysteins des aktiven Zentrums und einer Methylgruppe des Chlormethylketons ausgebildet. Zusätzlich kam es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Aminosäureresten der Substratbindestelle, so dass der CMK-Inhibitor in der Substratbindestelle fest gebunden wurde. Die SARS-CoV M^{pro} wird infolgedessen irreversibel gehemmt.

Im Rahmen der Testungen zur Inhibierung der NV-3CL^{pro} durch CMK konnte ein IC_{50} -Wert von 85 μM ermittelt werden. Somit stellt diese Substanz die potenteste unter den getesteten Substanzen zur Inhibierung der NV-3CL^{pro} dar. Wahrscheinlich wies bei den Inhibierungsversuchen der NV-3CL^{pro} das SARS-CoV spezifische Hexapeptidsubstrat ebenfalls eine gewisse Affinität zur Substratbindestelle der NV-3CL^{pro} auf, so dass das Enzym durch die Chlormethylketonverbindung gehemmt werden konnte.

Anhand des relativ hohen IC_{50} -Wertes von 85 μM ist allerdings erkennbar, dass die NV-3CL^{pro} zum SARS-CoV Hexapeptidsubstrat nicht hoch spezifisch ist.

Anhand der Studie von Yang *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Chlormethylketonverbindung für die Hemmung der SARS-CoV Proteaseaktivität verantwortlich ist (Yang *et al.*, 2003). Möglicherweise beruht die Hemmung der NV-3CL^{pro} in den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Inhibitionstests mit dem CMK-Inhibitor ebenfalls auf der Interaktion der Chlormethylketonverbindung mit der Substratbindestelle.

Zur Herstellung eines CMK-Inhibitors, der eine höhere Spezifität zur NV-3CL^{pro} aufweist, sollte die Chlormethylketongruppe an ein NV-spezifisches Peptidsubstrat synthetisiert werden. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnte diese neue Substanz allerdings nicht rechtzeitig synthetisiert werden.

5. Zusammenfassung

Der Replikation des NV-Genoms geht die kotranslationale Spaltung des vom *ORF1* kodierten Polyproteins durch die viruseigene Protease, voraus. Erst *in cis* und *in trans* Prozessierungen an definierten Spaltnativen innerhalb des Polyproteins ermöglichten die Freisetzung der strukturellen und nicht-strukturellen Proteine, die für den Aufbau des Replikationskomplexes und für die Initiation der Replikation essentiell sind. Die Regulation der Polyproteinprozessierung war allerdings bislang unbekannt. In der Charakterisierung der sequentiellen und differentiellen Prozessierung des Polyproteins bestand demnach die Hauptaufgabe dieser Arbeit. Dafür wurde zunächst ein NV-Volle-Länge-cDNA-Klon aus sechs sich überlappenden cDNA-Einzelfragmenten, unter Verwendung der *overlap-extension* PCR, hergestellt. Dieser Volle-Länge cDNA-Klon diente als Template für die Generierung von Vorläuferkonstrukten, die für die Charakterisierung der *in cis* und *in trans* Prozessierung des Polyproteins verwendet wurden. Die *cis*-Spaltung des Polyproteins konnte sowohl in *E.coli* als auch in humanen 293-T Zellen anhand eines Vorläuferproteins, das die komplette Sequenz der 3CL^{pro} enthält, die 5'-seitig von der Spaltstelle zum VPg Protein und 3'-seitig vom N-Terminus der 3DL^{pol} flankiert ist, verifiziert werden. Infolge der kotranslationalen *cis*-Spaltung dieses Vorläuferproteins kam es zur Freisetzung der 3CL^{pro}, die anschließend aufgereinigt wurde. Zusätzlich wurde das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} aufgereinigt, bei dem das Spaltnativ E/G zwischen der 3CL^{pro} und der 3DL^{pol} so mutiert wurde, dass die kotranslationale Spaltung des Fusionsproteins verhindert wurde. Anhand der 3CL^{pro} sowie dessen Vorläufers 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} sollte die differentielle und sequentielle Spaltung des Polyproteins *in trans* charakterisiert werden. Dafür wurden synthetisch hergestellte Peptide, die die authentischen Spaltnative innerhalb des Polyproteins aufwiesen, sowohl mit der 3CL^{pro} als auch mit der 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} in einem *trans*-Spaltungsassay inkubiert und anschließend die Spaltung mit Hilfe der *reversed-phase* Chromatographie analysiert. Im Rahmen dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass nur die Spaltnative zwischen dem N-terminalem Protein p37 und der 2C^{NTPase} sowie zwischen der 2C^{NTPase} und dem Protein p20 *in trans* von der 3CL^{pro} gespalten wurden. Massenspektrometrische Analysen wiesen nach, dass die Spaltungen jeweils zwischen den Aminosäureresten Q/G stattgefunden hatte. Zusätzlich zu den Peptiden p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20 konnte das Peptid VPg/3CL^{pro} durch das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} an der Schnittstelle E/G prozessiert werden. Anhand von Berechnungen zur relativen Spalteffizienz von 3CL^{pro} und 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol} wurde nachgewiesen, dass 3CL^{pro} eine signifikant höhere Spezifität zu den Spaltnativen der Peptide p37/2C^{NTPase} und 2C^{NTPase}/p20 aufwies als das Fusionsprotein 3CL^{pro}_{μE1189A}3DL^{pol}.

Die Spaltspezifität der $3CL^{pro}$ war dabei an dem Spaltnotiv zwischen der $2C^{NTPase}$ und dem Protein p20 signifikant höher als an dem Spaltnotiv zwischen dem N-terminalen Protein p37 und der $2C^{NTPase}$. *In vitro* Translationsstudien des NV-*ORF1* im zellfreien System bestätigten, dass die kotranslationale in *trans*-Spaltung des Polyproteins nur zwischen dem Protein p37 und der $2C^{NTPase}$ und der $2C^{NTPase}$ und dem Protein p20 stattfand. Darüber hinaus konnte anhand dieses Versuches gezeigt werden, dass die initiale Prozessierung des Polyproteins auf der *trans*-Aktivität der $3CL^{pro}$ beruht, was in der Freisetzung der Proteine p37, $2C^{NTPase}$ und des Fusionsproteins $VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ resultiert. Eine weitere Spaltung von $VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ konnte im Rahmen dieses Versuches nicht gezeigt werden. Mit Hilfe des humanen Zellkultursystems sollte anschließend untersucht werden, ob zelluläre Faktoren in die Prozessierung des p20VPg Vorläuferproteins involviert sind. Dafür wurden Koexpressionsstudien des Vorläuferproteins p20VPg mit dem $3CL^{pro}$ Vorläuferprotein $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ durchgeführt. Doch auch in dieser Expressionsstudie konnte eine Spaltung des Vorläuferproteins nicht beobachtet werden. Interessanterweise wurde allerdings die *cis*-Spaltung des Vorläuferproteins $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ durch die Koexpression mit $\Delta VPg3CL^{pro}\Delta 3DL^{pol}$ verhindert. Unter Verwendung des *trans*-Spaltungsassays konnte daraufhin *in vitro* verifiziert werden, dass p20VPg die Aktivität der $3CL^{pro}$ am Peptid p37/ $2C^{NTPase}$ signifikant reduzierte.

Der initiale Schritt der NV-Replikation basiert auf der Aktivität der $3CL^{pro}$. Eine Inaktivierung dieses Enzyms würde demnach den Replikationszyklus verhindern. Somit stellt dieses Enzym ein geeignetes Target für anti-NV Medikamente dar. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit mögliche $3CL^{pro}$ Inhibitoren getestet. Anhand dieser Testreihen konnte gezeigt werden, dass die Substanz CMK eine mögliche Grundlage, für die Entwicklung von NV- $3CL^{pro}$ spezifischen Chlormethylketon-Peptidanaloga als Inhibitoren, darstellen könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J.R., and Hilgenfeld, R. (2003) Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **300**: 1763-1767.
- Asanaka, M., Atmar, R.L., Ruvolo, V., Crawford, S.E., Neill, F.H., and Estes, M.K. (2005) Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10327-10332.
- Banerjee, R., Weidman, M.K., Echeverri, A., Kundu, P., and Dasgupta, A. (2004) Regulation of poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide. *J Virol* **78**: 9243-9256.
- Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., and Green, K.Y. (2003) In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* **77**: 10957-10974.
- Berke, T., Golding, B., Jiang, X., Cubitt, D.W., Wolfaardt, M., Smith, A.W., and Matson, D.O. (1997) Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *J Med Virol* **52**: 419-424.
- Black, D.N., Burroughs, J.N., Harris, T.J., and Brown, F. (1978) The structure and replication of calicivirus RNA. *Nature* **274**: 614-615.
- Blair, W.S., Nguyen, J.H., Parsley, T.B., and Semler, B.L. (1996) Mutations in the poliovirus 3CD proteinase S1-specificity pocket affect substrate recognition and RNA binding. *Virology* **218**: 1-13.
- Blakeney, S.J., Cahill, A., and Reilly, P.A. (2003) Processing of Norwalk virus nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* **308**: 216-224.
- Boniotti, B., Wirblich, C., Sibilia, M., Meyers, G., Thiel, H.J., and Rossi, C. (1994) Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* **68**: 6487-6495.
- Burroughs, J.N., and Brown, F. (1974) Physico-chemical evidence for the re-classification of the caliciviruses. *J Gen Virol* **22**: 281-286.
- Burroughs, J.N., and Brown, F. (1978) Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol* **41**: 443-446.
- Cai, Y., Fukushi, H., Koyasu, S., Kuroda, E., Yamaguchi, T., and Hirai, K. (2002) An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *J Vet Med Sci* **64**: 215-219.
- Canard, B., Chowdhury, K., Sarfati, R., Doublié, S., and Richardson, C.C. (1999) The motif D loop of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is critical for nucleoside 5'-triphosphate selectivity. *J Biol Chem* **274**: 35768-35776.

- Caul, E.O., and Appleton, H. (1982) The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol* **9**: 257-265.
- Caul, E.O. (1996) Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part II. The epidemiological perspective. *J Clin Pathol* **49**: 959-964.
- Chang, D.W., Ditsworth, D., Liu, H., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., and Yang, X. (2003) Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *J Biol Chem* **278**: 16466-16469.
- Cheetham, G.M., and Steitz, T.A. (1999) Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science* **286**: 2305-2309.
- Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M.G., and Saif, L.J. (2006) Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* **80**: 10372-10381.
- Cheetham, S., Souza, M., McGregor, R., Meulia, T., Wang, Q., and Saif, L.J. (2007) Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression. *J Virol* **81**: 3535-3544.
- Chen, R., Neill, J.D., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2006) X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8048-8053.
- Chibale, K. (2002) A chemical approach towards understanding the mechanism and reversal of drug resistance in *Plasmodium falciparum*: is it viable? *IUBMB Life* **53**: 249-252.
- Clarke, I.N., and Lambden, P.R. (1997) The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* **78** (Pt 2): 291-301.
- Clarke, I.N., and Lambden, P.R. (2000) Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis* **181 Suppl 2**: S309-316.
- Daughenbaugh, K.F., Fraser, C.S., Hershey, J.W., and Hardy, M.E. (2003) The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *Embo J* **22**: 2852-2859.
- Deneen, V.C., Hunt, J.M., Paule, C.R., James, R.I., Johnson, R.G., Raymond, M.J., and Hedberg, C.W. (2000) The impact of foodborne calicivirus disease: the Minnesota experience. *J Infect Dis* **181 Suppl 2**: S281-283.
- Ehresmann, D.W., and Schaffer, F.L. (1977) RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. *J Virol* **22**: 572-576.
- Ettayebi, K., and Hardy, M.E. (2003) Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* **77**: 11790-11797.

- Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., King, A.D., Mitra, T., Gorbalenya, A., and Green, K.Y. (2004) Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* **78**: 4827-4837.
- Fullerton, S.W., Blaschke, M., Coutard, B., Gebhardt, J., Gorbalenya, A., Canard, B., Tucker, P.A., and Rohayem, J. (2007) Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **81**: 1858-1871.
- Furuichi, Y., and Shatkin, A.J. (2000) Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv Virus Res* **55**: 135-184.
- Gettins, P.G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* **102**: 4751-4804.
- Gonin, P., Couillard, M., and d'Halewyn, M.A. (2000) Genetic diversity and molecular epidemiology of Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* **182**: 691-697.
- Gorlach, M., Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994) The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp Cell Res* **211**: 400-407.
- Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., and Thiel, H.J. (2000) Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* **181 Suppl 2**: S322-330.
- Greenberg, H.B., Valdesuso, J.R., Kalica, A.R., Wyatt, R.G., McAuliffe, V.J., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. (1981) Proteins of Norwalk virus. *J Virol* **37**: 994-999.
- Hanecak, R., Semler, B.L., Ariga, H., Anderson, C.W., and Wimmer, E. (1984) Expression of a cloned gene segment of poliovirus in *E. coli*: evidence for autocatalytic production of the viral proteinase. *Cell* **37**: 1063-1073.
- Hansen, J.L., Long, A.M., and Schultz, S.C. (1997) Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**: 1109-1122.
- Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Watanabe, K., Nagata, K., and Toyoda, T. (2003) Inhibition of the protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit by viral matrix protein. *Microbiol Immunol* **47**: 521-526.
- Hardy, M.E., Crone, T.J., Brower, J.E., and Ettayebi, K. (2002) Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Res* **89**: 29-39.
- Hardy, M.E. (2005) Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 1-8.
- Harrington, P.R., Lindesmith, L., Yount, B., Moe, C.L., and Baric, R.S. (2002) Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol* **76**: 12335-12343.
- Harrington, P.R., Vinje, J., Moe, C.L., and Baric, R.S. (2004) Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol* **78**: 3035-3045.

- Harris, K.S., Reddigari, S.R., Nicklin, M.J., Hammerle, T., and Wimmer, E. (1992) Purification and characterization of poliovirus polypeptide 3CD, a proteinase and a precursor for RNA polymerase. *J Virol* **66**: 7481-7489.
- Hellen, C.U., and Sarnow, P. (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**: 1593-1612.
- Herbert, T.P., Brierley, I., and Brown, T.D. (1997) Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* **78** (Pt 5): 1033-1040.
- Herzog, K. (2004) Norovirus (Caliciviridae) Proteinexpression und Genomanalyse. *Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der TU-Dresden; Fachrichtung Biologie*.
- Högbom, M., Robel, I., Jäger, K., Unge, T., Jones, A., and Rohayem, J. (2007) Structural and Functional Characterization of the Norovirus RNA-dependent RNA Polymerase, submitted. *Int. J. Mol. Sci* **8**.
- Huang, P., Farkas, T., Marionneau, S., Zhong, W., Ruvoen-Clouet, N., Morrow, A.L., Altaye, M., Pickering, L.K., Newburg, D.S., LePendou, J., and Jiang, X. (2003) Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis* **188**: 19-31.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Marcus, D.M., and Estes, M.K. (2003) Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J Virol* **77**: 405-415.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., and Estes, M.K. (1993) Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* **195**: 51-61.
- Kapikian, A.Z. (1996) Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol Suppl* **12**: 7-19.
- Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., and Virgin, H.W.t. (2003) STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* **299**: 1575-1578.
- Koch, J., Schneider, T., Stark, K., and Schreier, E. (2006) Norovirusinfektionen in Deutschland. *Springer Medizin Verlag*: 296–309.
- König, M., Thiel, H.J., and Meyers, G. (1998) Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* **72**: 4492-4497.
- Kramer, D. (2007) Untersuchung zur Rolle der viralen Enzyme bei der Replikation der Caliciviren am Beispiel des Feline Calicivirus. *Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der TU-Dresden; Fachrichtung Biologie*.
- Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Lee, C.K., and Wimmer, E. (1988) Polyprotein processing in picornavirus replication. *Biochimie* **70**: 119-130.
- Kuhn, R.J.a.W., E. (1987) The Molecular Biology of Positive Strand RNA Viruses. In *Academic Press*. Rowlands D.J., M.B.W.J., Mayo M. (ed). London, pp. 17-51.

- Kuyumcu-Martinez, N.M., Van Eden, M.E., Younan, P., and Lloyd, R.E. (2004) Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol Cell Biol* **24**: 1779-1790.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lambden, P.R., Caul, E.O., Ashley, C.R., and Clarke, I.N. (1993) Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* **259**: 516-519.
- Lambden, P.R., Liu, B., and Clarke, I.N. (1995) A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the Caliciviridae. *Virus Genes* **10**: 149-152.
- Liu, B., Clarke, I.N., and Lambden, P.R. (1996) Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* **70**: 2605-2610.
- Liu, B.L., Clarke, I.N., Caul, E.O., and Lambden, P.R. (1995) Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch Virol* **140**: 1345-1356.
- Liu, B.L., Viljoen, G.J., Clarke, I.N., and Lambden, P.R. (1999) Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in E. coli. *J Gen Virol* **80** (Pt 2): 291-296.
- Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoen, N., Clement, M., and Le Pendu, J. (2001) ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* **83**: 565-573.
- Marionneau, S., Ruvoen, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., and Le Pendu, J. (2002) Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**: 1967-1977.
- Matrai, J., Verheyden, G., Kruger, P., and Engelborghs, Y. (2004) Simulation of the activation of alpha-chymotrypsin: analysis of the pathway and role of the propeptide. *Protein Sci* **13**: 3139-3150.
- Mayo, M.A. (2002) Virus taxonomy - Houston 2002. *Arch Virol* **147**: 1071-1076.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., and Tauxe, R.V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* **5**: 607-625.
- Mikami, O., Park, J.H., Kimura, T., Ochiai, K., and Itakura, C. (1999) Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* **66**: 237-242.

- Mosimann, S.C., Cherney, M.M., Sia, S., Plotch, S., and James, M.N. (1997) Refined X-ray crystallographic structure of the poliovirus 3C gene product. *J Mol Biol* **273**: 1032-1047.
- Nakamura, K., Someya, Y., Kumasaka, T., Ueno, G., Yamamoto, M., Sato, T., Takeda, N., Miyamura, T., and Tanaka, N. (2005) A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *J Virol* **79**: 13685-13693.
- Nakata, S., Honma, S., Numata, K.K., Kogawa, K., Ukae, S., Morita, Y., Adachi, N., and Chiba, S. (2000) Members of the family caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J Infect Dis* **181**: 2029-2032.
- Neill, J.D., and Mengeling, W.L. (1988) Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res* **11**: 59-72.
- Ng, K.K., Pendas-Franco, N., Rojo, J., Boga, J.A., Machin, A., Alonso, J.M., and Parra, F. (2004) Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J Biol Chem* **279**: 16638-16645.
- Nicklin, M.J., Krausslich, H.G., Toyoda, H., Dunn, J.J., and Wimmer, E. (1987) Poliovirus polypeptide precursors: expression in vitro and processing by exogenous 3C and 2A proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4002-4006.
- Oka, T., Katayama, K., Ogawa, S., Hansman, G.S., Kageyama, T., Ushijima, H., Miyamura, T., and Takeda, N. (2005) Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* **79**: 7283-7290.
- Oka, T., Yamamoto, M., Yokoyama, M., Ogawa, S., Hansman, G.S., Katayama, K., Miyashita, K., Takagi, H., Tohya, Y., Sato, H., and Takeda, N. (2007) Highly Conserved Configuration of Catalytic Amino Acid Residues among Calicivirus-Encoded Proteases. *J Virol* **81**: 6798-6806.
- Ollis, D.L., Kline, C., and Steitz, T.A. (1985) Domain of E. coli DNA polymerase I showing sequence homology to T7 DNA polymerase. *Nature* **313**: 818-819.
- Pallai, P.V., Burkhardt, F., Skoog, M., Schreiner, K., Bax, P., Cohen, K.A., Hansen, G., Palladino, D.E., Harris, K.S., Nicklin, M.J., and et al. (1989) Cleavage of synthetic peptides by purified poliovirus 3C proteinase. *J Biol Chem* **264**: 9738-9741.
- Paul, A.V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J.H., and Wimmer, E. (2003) Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* **77**: 891-904.
- Pfister, T., and Wimmer, E. (1999) Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J Biol Chem* **274**: 6992-7001.
- Pogulis, R.J., Vallejo, A.N., and Pease, L.R. (1996) In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods Mol Biol* **57**: 167-176.

- Polgar, L. (2005) The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2161-2172.
- Prasad, B.V., Matson, D.O., and Smith, A.W. (1994) Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol* **240**: 256-264.
- Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., and Estes, M.K. (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**: 287-290.
- Rohayem, J., Berger, S., Juretzek, T., Herchenroder, O., Mogel, M., Poppe, M., Henker, J., and Rethwilm, A. (2004) A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods* **118**: 49-59.
- Rohayem, J., Robel, I., Jager, K., Scheffler, U., and Rudolph, W. (2006) Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol* **80**: 7060-7069.
- Rohayem, J. (2007) Habilitationsschrift zur Erlangung des Titels "Doktor medicinae habilitatus", TU-Dresden.
- Sarubbi, E., Seneci, P.F., Angelastro, M.R., Peet, N.P., Denaro, M., and Islam, K. (1993) Peptide aldehydes as inhibitors of HIV protease. *FEBS Lett* **319**: 253-256.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**: 157-162.
- Schultz, R.M., Varma-Nelson, P., Ortiz, R., Kozlowski, K.A., Orawski, A.T., Pagast, P., and Frankfater, A. (1989) Active and inactive forms of the transition-state analog protease inhibitor leupeptin: explanation of the observed slow binding of leupeptin to cathepsin B and papain. *J Biol Chem* **264**: 1497-1507.
- Seah, E.L., Marshall, J.A., and Wright, P.J. (1999) Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol* **73**: 10531-10535.
- Someya, Y., Takeda, N., and Miyamura, T. (2002) Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. *J Virol* **76**: 5949-5958.
- Sosnovtsev, S.V., Sosnovtseva, S.A., and Green, K.Y. (1998) Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol* **72**: 3051-3059.
- Sosnovtsev, S.V., Garfield, M., and Green, K.Y. (2002) Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol* **76**: 7060-7072.
- Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Chang, K.O., Onwudiwe, O., and Green, K.Y. (2005) Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* **79**: 4012-4024.

- Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Chang, K.O., Prikhodko, V.G., Thackray, L.B., Wobus, C.E., Karst, S.M., Virgin, H.W., and Green, K.Y. (2006) Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* **80**: 7816-7831.
- Sosnovtseva, S.A., Sosnovtsev, S.V., and Green, K.Y. (1999) Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol* **73**: 6626-6633.
- Takegami, T., Semler, B.L., Anderson, C.W., and Wimmer, E. (1983) Membrane fractions active in poliovirus RNA replication contain VPg precursor polypeptides. *Virology* **128**: 33-47.
- Tan, M., Huang, P., Meller, J., Zhong, W., Farkas, T., and Jiang, X. (2003) Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* **77**: 12562-12571.
- Tan, M., and Jiang, X. (2005) Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* **13**: 285-293.
- Thomas, H., Havlis, J., Peychl, J., and Shevchenko, A. (2004) Dried-droplet probe preparation on AnchorChip targets for navigating the acquisition of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectra by fluorescence of matrix/analyte crystals. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**: 923-930.
- van Dijk, A.A., Makeyev, E.V., and Bamford, D.H. (2004) Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J Gen Virol* **85**: 1077-1093.
- Vinje, J., Altena, S.A., and Koopmans, M.P. (1997) The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* **176**: 1374-1378.
- Wawrzekiewicz, J., Smale, C.J., and Brown, F. (1968) Biochemical and biophysical characteristics of vesicular exanthema virus and the viral ribonucleic acid. *Arch Gesamte Virusforsch* **25**: 337-351.
- Westerik, J.O., and Wolfenden, R. (1972) Aldehydes as inhibitors of papain. *J Biol Chem* **247**: 8195-8197.
- Wirblich, C., Sibilio, M., Boniotti, M.B., Rossi, C., Thiel, H.J., and Meyers, G. (1995) 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J Virol* **69**: 7159-7168.
- Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., and Virgin, H.W. (2004) Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* **2**: e432.

- Yang, H., Yang, M., Ding, Y., Liu, Y., Lou, Z., Zhou, Z., Sun, L., Mo, L., Ye, S., Pang, H., Gao, G.F., Anand, K., Bartlam, M., Hilgenfeld, R., and Rao, Z. (2003) The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13190-13195.
- Ye, S., and Goldsmith, E.J. (2001) Serpins and other covalent protease inhibitors. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 740-745.
- Zeitler, C.E., Estes, M.K., and Venkataram Prasad, B.V. (2006) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus protease at 1.5-Å resolution. *J Virol* **80**: 5050-5058.
- Ziebuhr, J., Herold, J., and Siddell, S.G. (1995) Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity. *J Virol* **69**: 4331-4338.

Quellen aus dem Internet:

[1]: http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine_protease

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Gehard Rödel für sein reges Interesse am Voranschreiten dieser Arbeit sowie für seine Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jacques Rohayem, der mir ermöglicht hat, im *Calicilab* des Instituts für Virologie meine Promotionsarbeit zu verfassen. Er hat mit vielen konstruktiven Ratschlägen und kritischen Auseinandersetzungen zum entscheidenden Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Enno Jacobs danke ich für die Unterstützung und das fortwährende Interesse an meiner Arbeit sowie die schönen Wandertage und Weihnachtsfeiern des Instituts.

Bei Herrn Dr. Wolfram Rudolph möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass er mir sein biochemisches Wissen über die „Welt der Proteine“ offenbart hat und mich somit tatkräftig bei den Proteinaufreinigungen unterstützt hat.

Julia Gebhardt sag ich Danke für die Bereitstellung der Antikörperseren. Das wunderbare anti-3CL^{pro} Serum erlaubte mir die Beantwortung der im Rahmen dieser Arbeit aufkommenden Fragestellungen.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des gesamten „Calicilabs“ sowie der Arbeitsgruppe „Lindemann“, die jederzeit für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Im Speziellen möchte ich mich bei Manuela Rieger und Marc Cartellieri für die viele Zeit und das Engagement bedanken, die sie für die Korrekturlesung meiner Arbeit aufgebracht haben.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Rolf Hilgenfeld bedanken, dass er als Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung steht. Seiner gesamten Arbeitsgruppe am biochemischen Institut der Universität Lübeck möchte ich dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben erste Erfahrungen auf dem Gebiet der Kristallographie zu sammeln und mich offen und freundlich in Ihr Team aufgenommen haben.

Von ganzen Herzen bedank ich mich bei meinen lieben Eltern, die mich jederzeit mit Ihrer Liebe und all Ihren Kräften unterstützt haben und mir somit diesen Weg überhaupt erst ermöglicht haben.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Ulrike Scheffler
Anschrift:	Rötelstrasse 85; 8037 Zürich Schweiz
Mobil:	+41762221342
E-Mail:	ulrike.scheffler@roche.com
Geburtsdatum und -ort:	26.07.1978 in Dresden
Familienstand:	ledig

Ausbildung/Wissenschaftlicher Werdegang

09/1992-07/1997:	Schulbesuch des Gymnasiums Dreikönigsschule in Dresden
10/1997-04/2003:	Biologiestudium an der TU-Dresden; Schwerpunkte: Genetik, Immunologie, Zellkommunikation
07-09/2000:	Praktikum an der Universität von Otago in Dunedin/ Neuseeland, Department of Microbiology, Virus Research Unit
04/2002-04/2003:	Diplomarbeit am Lehrstuhl für allgemeine Genetik an der TU-Dresden
11/2002:	Forschungsaufenthalt am physiologisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls Universität in Tübingen
03/2004-02/2007:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotionsstudentin) am Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät der TU-Dresden
02/2006:	Proteinexpressions- und Kristallographiekurs am Institut für Biochemie der Universität Lübeck

Versicherung

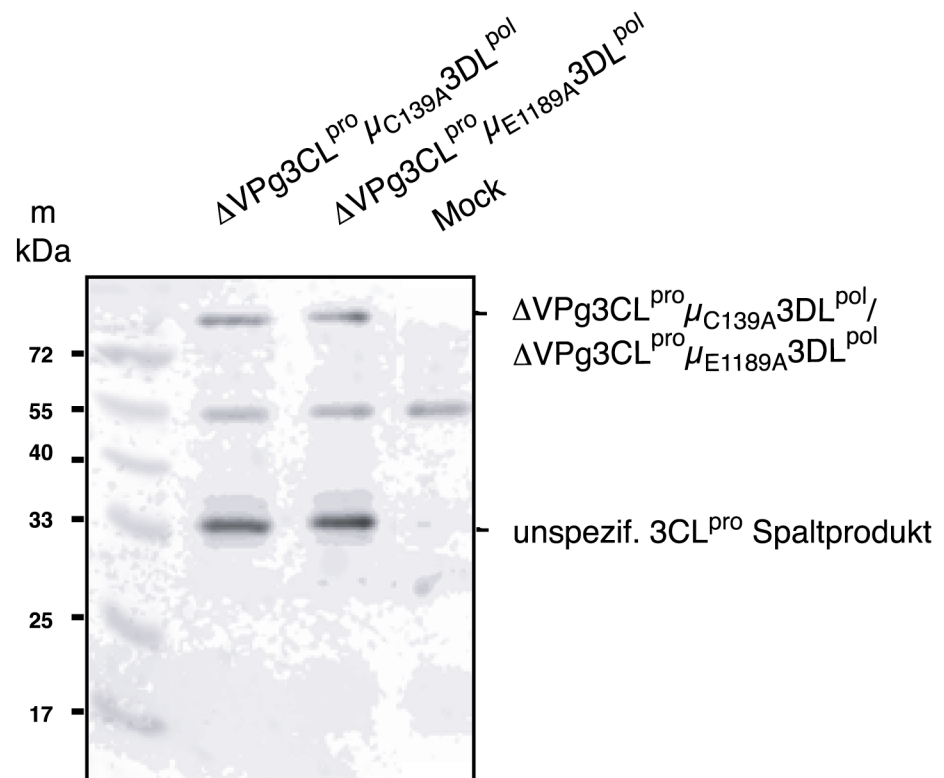
Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie der medizinischen Fakultät der TU Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Dr. Jacques Rohayem angefertigt.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften an der Technischen Universität Dresden vom 20. März 2000 wird anerkannt.

Dresden, den 04. Januar 2008

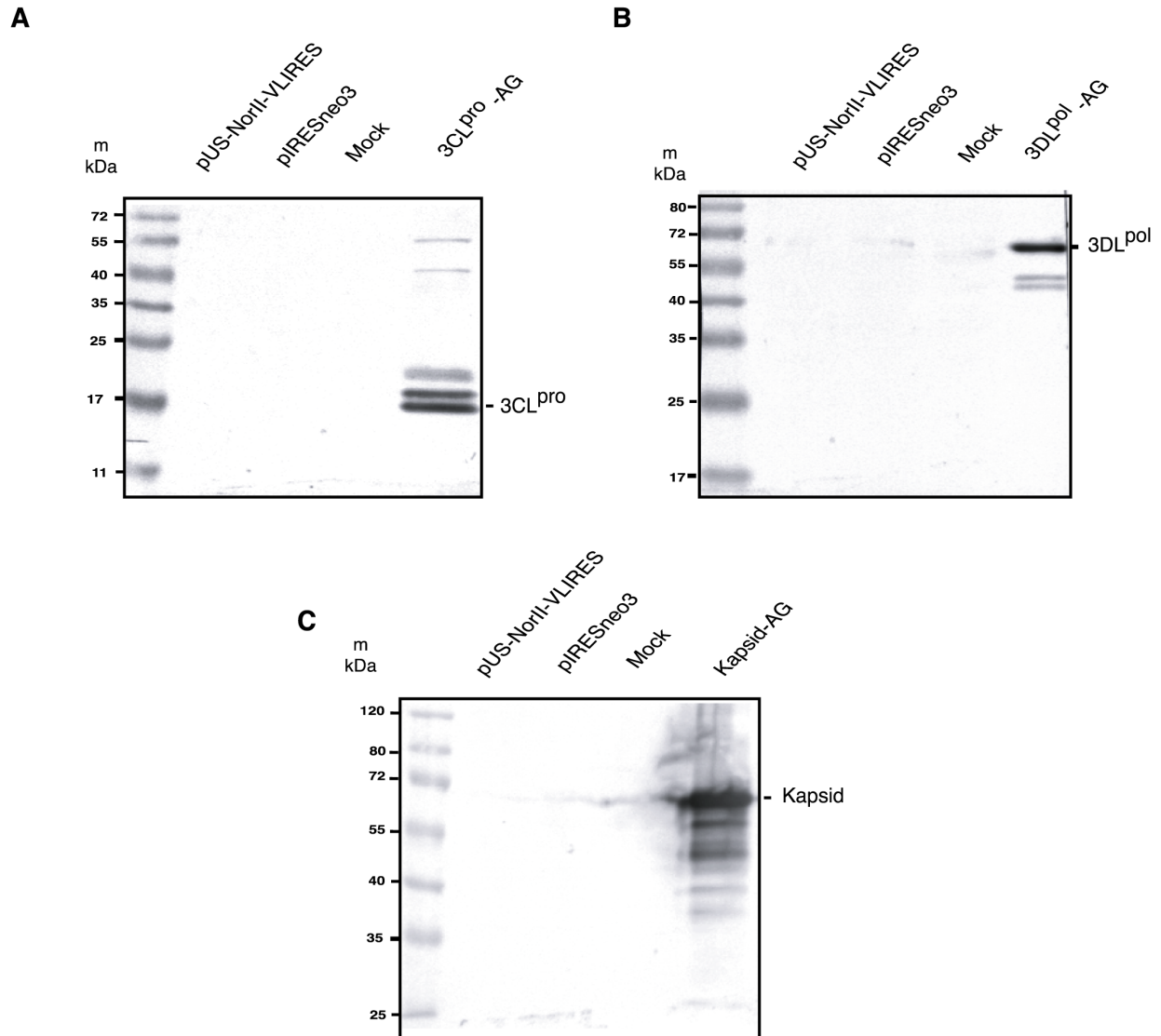
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Scheffler', with a long horizontal stroke extending to the right.

Ulrike Scheffler



Anhang 1: Unspezifische Spaltung des $\Delta VPg3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}$ Fusionsproteins

E.coli Zellen wurden mit dem Konstrukt $pUSNORII-\Delta VPg3CL^{pro}\mu_{C139A}3DL^{pol}IRES$ (Spur 2), das ein inaktives katalytisches Zentrum der 3CL^{pro} aufweist und mit dem Konstrukt $pUSNORII-\Delta VPg3CL^{pro}\mu_{E1189A}3DL^{pol}IRES$ (Spur 3) transformiert und anschließend die Expression mit IPTG induziert (siehe 2.2.8.1). Als Negativkontrollen wurden die Zellen nur mit dem Plasmid $pET28b$ transformiert (Spur 4) Nach ü.N. Inkubation wurden die durch Zentrifugation der *E.coli* Suspensionskultur gewonnen Zellpellets in 6xLadepuffer aufgenommen, in der SDS-Page aufgetrennt und immunologisch durch Western Blot Analyse mit einem polyklonalen rabbit-anti-3CL^{pro} Antikörperserum analysiert.



Anhang 2: Expression des NV-GGII/4 Volle-Länge-cDNA Klons im eukaryotischen Zellsystem

Der NV-Volle Länge cDNA Klon pUS-NORII-VLIREs wurde in 293T Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde nur das Plasmid pIRESneo3 in 293T-Zellen transfiziert. Als Mockkontrolle wurden untransfizierte Zellen mitgeführt. Nach 48 h Proliferationszeit wurden die Zellen, wie unter 2.2.7.6 beschrieben, geerntet. Die Zelllysate wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Untersuchung der Expression des Volle-Länge Klons erfolgte mit Hilfe der Immundetektion unter Verwendung von **a**, einem polyklonalen rabbit-anti-3CL^{pro} Serum (1:15000); **b** einem polyklonalen rabbit-anti-3DL^{pol} Serum (1: 1000) und **c**, dem polyklonalen rabbit-anti-Kapsid Serums (1:2000).